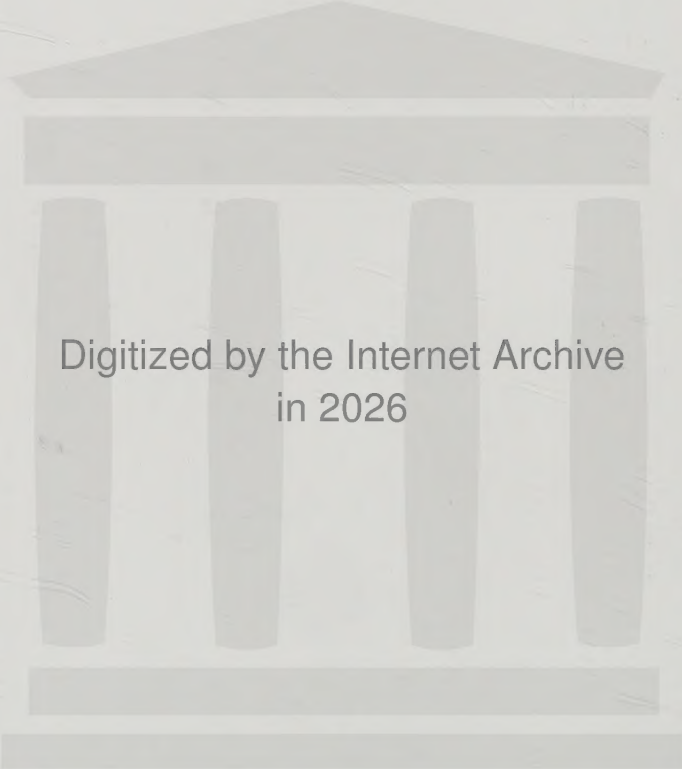


**Die Ausscheidung von
Tryptophanabbauprodukten im Harn
von Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel**

Lucius Maiwald

Druck: Anneliese Schubert, München 5, Corneliusstraße 21, Telefon 221777



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41555221_0074

AUS DER II. MEDIZINISCHEN KLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL

DIE AUSSCHIEDUNG VON TRYPTOPHANABBAUPRODUKTEN IM HARN
VON PATIENTEN MIT VITAMIN - B₆ - MANGEL

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
verfasst und einer Hohen Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Lucius Maiwald
aus München

München 1959



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Dozent Dr. H. MASKE
Mitberichterstatter: Professor Dr. Dr. G. BODECHTEL
Dekan: Professor Dr. K. KOLLE

Tag der mündlichen Prüfung: 30.6.1959

MEINER LIEBEN FRAU

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	
A. Der Abbau von Tryptophan zu Nicotinsäure und die damit verbundenen Reaktionen	7
B. Andere Abbauwege des Tryptophans	15
C. Die Tryptophansynthese	17
D. Die Fermente und Cofermente des Tryptophanstoffwechsels	18
E. Der Tryptophanstoffwechsel beim Menschen	23
F. Problemstellung der Arbeit	26
 UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE	
A. Untersuchungen über das Auftreten von Metaboliten im Harn nach Injektion von Tryptophan-Derivaten	29
B. Untersuchungen über das Auftreten von Metaboliten im Harn nach oraler Belastung mit d-Tryptophan	29
C. Untersuchungen über das Auftreten von Metaboliten im Harn nach oraler Belastung mit dl-Tryptophan bei Stoffwechselgesunden	30
D. Untersuchungen über das Auftreten von Metaboliten im Harn nach oraler Belastung mit dl-Tryptophan bei Patienten mit einem Vitamin-B ₆ -Mangel	33
E. Untersuchungen über das Auftreten von Metaboliten im Harn von Vitamin-B ₆ -Mangel-Patienten nach nochmaliger Belastung mit dl-Tryptophan und bei Vitamin-B ₆ -Behandlung	37

F. Vergleich der Metabolitenausscheidung im Harn von Stoffwechselgesunden und von Patienten mit Vitamin-B ₆ -Mangel nach oraler Belastung mit dl-Tryptophan	39
G. Vergleich der Metabolitenausscheidung im Harn von Stoffwechselgesunden und von Patienten mit Vitamin-B ₆ -Mangel nach Vitamin-B ₆ -Behandlung und nochmaliger Belastung	42
H. Untersuchungen über die Dauer der Ausscheidung von Metaboliten nach dl-Tryptophangabe bei Stoffwechselgesunden und bei Patienten mit einem Vitamin-B ₆ -Mangel ..	43
I. Methodische Probleme	45
J. Diskussion der Ergebnisse	51
K. Zusammenfassung	55

METHODEN

A. Klinische Versuchsanordnung	57
B. Die quantitative Xanthurensäurebestimmung	57
C. Die papierchromatographische Untersuchung	58
D. Vergleich der angewendeten Methode mit der Methode zur Gewinnung von Harnkonzentraten nach Dalglish	64

EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG

A. DER ABBAU DES TRYPTOPHANS ZUR NIKOTINSÄURE UND DIE DAMIT VERBUNDENEN REAKTIONEN

Tryptophan - - Kynurensäure. Lange, bevor das Tryptophan als essentielle Aminosäure erkannt wurde (1), fand LIEBIG im Hühnerharn und im Harn des südamerikanischen Steppenwolfes ein Abbauprodukt desselben, die Kynurensäure (2). Nachdem bewiesen war, der Fleischgenuss führt zu einer vermehrten Ausscheidung dieses Stoffes (3), ferner, dass Eiweiss mit unvollständiger Aminosäurezusammensetzung im Fütterungsversuch keine Erhöhung der Ausscheidung zur Folge hat (4), konnte durch eine parenterale Zufuhr von Tryptophan eine Mehrausscheidung an Kynurensäure beim Hund erzielt werden (5). Versuche an anderen Tieren bei subkutaner Verabreichung von Tryptophan zeigten, dass beim Kaninchen eine Ausscheidung von Kynurensäure auftritt, obwohl diese dort normaler Weise nicht als Harnbestandteil vorkommt (6). Die Frage nach einer weiteren Umsetzung der Kynurensäure konnte durch Experimente am Hund zunächst noch nicht befriedigend beantwortet werden (7). Dagegen wurden im Harn von Menschen und Kaninchen weitere Abbauprodukte des Tryptophans festgestellt (8, 9). Zunächst gelang der Nachweis des Kynurenins im Harn parenteral mit Tryptophan belasteter Kaninchen (10). Weitere Arbeiten, vor allem japanischer Autoren, unterstützten diesen Befund und verneinten die Existenz der Indolbrenztraubensäure als Zwischenprodukt der Kynurensäurebildung aus Tryptophan (11). Ferner fand MUSAJO (12), dass neben der Kynurensäure bei Ausscheidungsversuchen auch Xanthurensäure gebildet werden kann. Über die Existenz weiterer Abbauprodukte in der Reaktion zur Kynurensäure wie Formylkynurenin (13) bzw. α -Hydroxy-Tryptophan (14) als erste Abbaustufen des Tryptophans ist bis heute nichts sicheres bekannt.

Weitere Arbeiten dienen der Festigung der gewonnenen Erkenntnisse über

den Abbauweg Tryptophan -- Kynurensäure: Zunächst bestätigten Versuche mit Isotopen den Abbau des Tryptophans zur Kynurensäure (15). Dabei liess sich der in β -Stellung markierte Kohlenstoff des Tryptophans nach Verfütterung desselben als β -Kohlenstoff des Kynurenins und als Bestandteil der Kynurensäure nachweisen. Ausserdem zeigte SCHAYER (16), dass radioaktiver Stickstoff des Indolringes im Tryptophan in den ausgeschiedenen Stoffen Kynurenin, Kynurensäure und Xanthurensäure wieder zu finden ist, wenn derart markiertes Tryptophan verfüttert wird. Der gleiche Autor wies nach, dass ein Umbau des Tryptophans zu Pyrrol und Protoporphyrin nicht anzunehmen ist, dass aber der markierte Indolstickstoff auch in anderen Aminosäuren gefunden werden kann (17).

WISS (18) fügte drei entscheidende Erkenntnisse dem Gewonnenen bei: Zunächst machte er das bisher immer noch hypothetische Zwischenprodukt ELLINGER's, die o-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure, von Neuem wahrscheinlich. Er erklärte dessen Entstehung durch eine intermediär stattfindende Umaminierung. Auch stellte er fest, dass Brenztraubensäure und a-Keto-Glutarsäure bei der Kynurensäurebildung aus Kynurenin in den verwendeten Leber- und Nierenextrakten enthalten sein müssen. Seine Annahme der o-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure gewann vor allem dadurch an Beweiskraft, dass Pyridoxal-5-Phosphat als Coenzym der hier notwendig wirksamen Transaminase erkannt werden konnte (19). Endlich konnte WISS (20) zeigen, dass die von MUSAJO (12) bei Ausscheidungsversuchen gefundene Xanthurensäure aus 3-Hydroxy-Kynurenin, einem Oxydationsprodukt des Kynurenins, entsteht, wie aus Kynurenin die Kynurensäure.

Kynurenin -- Anthranilsäure. Während so weitere Chinolinstruktur aufweisende Stoffe mit dem Tryptophanabbau in Verbindung gebracht werden konnten war längst bekannt, dass unter physiologischen Verhältnissen auch eine Aufspaltung des Kynurenins zu anderen Abbauprodukten stattfinden kann. Den ersten Hinweis dafür lieferte KOTAKE (21), der bei Verfütterung von Tryptophan an Katzen Anthranilsäure im Harn der Tiere nachweisen konnte. Den gleichen Stoff fand er nach Zusatz von Kynurenin zu Katzenleberbrei. Auch er nahm das intermediäre Vorhandensein von o-Amin-Benzoyl-Brenztraubensäure an, deren oxydativer Seitenkettenabbau zu Anthranilsäure führen sollte. WISS und andere Autoren (22) erweiterten den Befund, indem sie feststellten, dass neben der Anthranilsäure eine äquivalente Menge Alanin gebildet wird, wodurch die Annahme eines

oxydativen Abbaus in Frage gestellt war. Während nun für die Alaninbildung aus dem Kynurenin eine zyklische Transaminierung diskutiert wurde, bei der die aus o-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure abgespaltene Brenztraubensäure desaminierend auf Kynurenin einwirken und so zu Alanin werden sollte (23), klärte WISS (24) den Spaltungsmechanismus auf: Hatte er früher die Eigenschaften des bei der Spaltung wirksamen Ferments beschrieben und sein Vorkommen (25), zeigte er nun, dass Alanin direkt aus der Kynurenin-Seitenkette entsteht mit Hilfe des spaltenden Ferments Kynureninase, welches von der Transaminase zu unterscheiden ist. Eine Abhängigkeit der Kynurensäurebildung von der der Anthranilsäure, die man an *Pseudomonas fluorescens* nachzuprüfen suchte, oder umgekehrt eine ähnliche Beziehung, konnte nicht festgestellt werden (26).

Tryptophan als Provitamin. Eine neue Bedeutung bekam der Abbau des Tryptophans, als seine Bedeutung für die Entstehung der Nikotinsäure erkannt wurde. KREHL und Mitarbeiter (27) wiesen nach, dass neben der Nikotinsäure, deren Rolle als Pellagra-Schutzstoff ELVEHJEM (28) erkannt hatte, auch das Tryptophan im Fütterungsversuch die auftretenden Mangelsymptome nikotinsäurefrei ernährter Tiere zu beseitigen vermag. Daran anschließende Belastungsversuche mit Tryptophan an Tieren und auch an Menschen führten zum Nachweis erhöhter Nikotinsäureamid- bzw. Trigonellinamidmengen im Harn (29), die auch gefunden werden konnten, wenn Nikotinsäure im Überschuss verabfolgt worden war (30). Den schlüssigen Beweis für die Nikotinsäurebildung aus Tryptophan lieferten die Versuche mit markiertem Tryptophan, dessen C(3)-Kohlenstoffatom in der Karboxylgruppe der ausgeschiedenen Nikotinsäurederivate nachgewiesen werden konnte (31).

Der Reaktionsweg der Nikotinsäure. Andere Forscher verfolgten den Weg, auf dem die Nikotinsäure aus dem Tryptophan entsteht. BEADLE und Mitarbeiter (32) verwendeten dabei durch Röntgenstrahlen der UV-Licht entstandene Mutanten der wilden Form von *Neurospora crassa*, deren Nährböden Tryptophan oder Nikotinsäure für das Wachstum enthalten müssen. Die gleichen Autoren waren auch die ersten, die auf Grund der chemisch-strukturellen Verschiedenheit zwischen Nikotinsäure und Tryptophan einen Übergang in mehreren Abbaustufen vermuteten.

Ihre Annahme fand dadurch Bestätigung, dass Kynurenin im Wachstumsversuch als ebenso wirksam befunden werden konnte (33), dazu aber noch ein neu hinzu tretender Stoff, die 3-Hydroxy-Anthranilsäure (34). Dass auch diese Substanz in unmittelbarem Zusammenhang mit dem Abbau des Tryptophans bei den Neurosporamutanten steht, konnten BONNER und YANOFSKY (35) beweisen, denen es gelang, nicht nur das Kynurenin, sondern auch die 3-Hydroxy-Anthranilsäure aus den Nährböden zu isolieren. Die Übertragung der an Neurosporamutanten erhobenen Befunde auf den Tierversuch stiess zunächst auf Schwierigkeiten (36) in dem Fütterungsversuche an pellagrakranken Ratten mit Kynurenin zu keinem Erfolg führten. Dagegen liess sich die Nikotinsäure ohne weiteres durch 3-Hydroxy-Anthranilsäure ersetzen (37). Schliesslich ergab sich aber, dass auch Kynurenin wirksam ist, wenn es täglich an nikotinsäurefrei ernährte Ratten verfüttert wird (38). Es war naheliegend, auch die Anthranilsäure bezüglich ihrer Fähigkeit zu versuchen, Nikotinsäure im Tierexperiment zu ersetzen. Sie erwies sich als unwirksam (39).

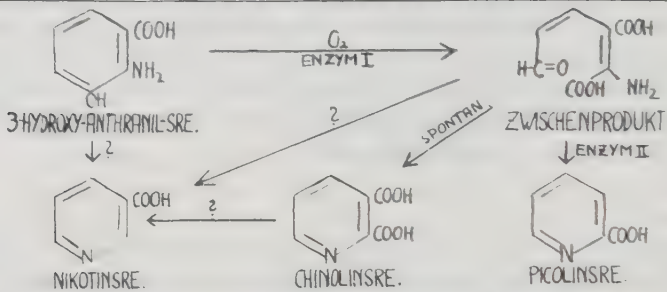
Die Entstehung der Nikotinsäure. Für die Vorstellung über die Nikotinsäureentstehung aus dem Tryptophan war die Herkunft des offenen Zwischenproduktes 3-Hydroxy-Anthranilsäure von besonderem Interesse. Man nahm zunächst an, dass vor der Abspaltung des Alanins aus dem Kynurenin eine Oxydation desselben zu 3-Hydroxy-Kynurenin stattfindet, aus dem sich dann 3-Hydroxy-Anthranilsäure durch Alaninabspaltung bilden kann (40). Als beweisend für diesen Reaktionsweg wurde angesehen, dass bei Fütterungsversuchen mit markiertem Tryptophan weder das β -C-Atom, noch das der Carboxylgruppe des Tryptophans in den ausgeschiedenen Nikotinsäurederivaten wieder zu finden waren. Noch bevor GREENBERG und SANADI (41) ihre Vermutung über einen oxydativen Abbau von 3-Hydroxy-Kynurenin über o-Amino, m-Hydroxy-Benzoyl-Brenztraubensäure und o-Amino, m-Hydroxy-Benzoylessigsäure zu 3-Hydroxy-Anthranilsäure ausgesprochen hatten, konnte WISS (42) durch Untersuchungen über die spezifische Wirkung der Kynureninase Klarheit schaffen: Er fand, dass dieses Ferment nicht nur das Kynurenin, sondern auch andere α -Amino, γ -Ketosäuren, wie eben das 3-Hydroxy-Kynurenin, zu spalten in der Lage ist, worauf die Transaminase in analoger Weise wie bei Kynurenin wirksam werden kann und zur Bildung von 3-

Hydroxy-Anthranilsäure führt. Damit war nicht nur die Herkunft der 3-Hydroxy-Anthranilsäure geklärt, sondern auch endgültig das Vorhandensein des 3-Hydroxy-Kynurenins als Intermediärprodukt des Tryptophanabbaus bewiesen. Ausserdem fanden BUTENANDT, WEIDEL und SCHLOSSBERGER (43), dass dieser Stoff auch eine Bedeutung als Zwischenstufe bei der Bildung von Ommochromen hat.

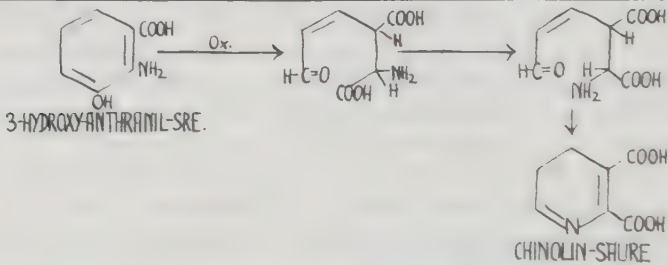
Chinolinsäure, ein weiteres Abbauprodukt. Über den letzten Schritt des Tryptophanabbaus zur Nikotinsäure über die 3-Hydroxy-Anthranilsäure wird bis heute noch gearbeitet. Man stellte nämlich fest, dass ausser der 3-Hydroxy-Anthranilsäure auch Chinolsäure zu einer vermehrten Ausscheidung von Trigonellinamid im Harn von Ratten führt (44). Während dieser Befund weiteren Nachprüfungen standhielt, konnten BUTENANDT und SCHLOSSBERGER (45) die Annahme von MAKINO (46) widerlegen, dass auch 3,4-Dihydroxy-Anthranilsäure bzw. 3,4-Dihydroxy-Kynurenin beim Tryptophanstoffwechsel eine Rolle spielen. Sie prüften die Einwirkung von 3,4-Dihydroxy-Kynurenin an *Neurospora*, bei der Augenpigmentbildung und als Substrat der Kynureninase, sahen jedoch keine Beeinflussung der Nikotinsäure- bzw. Ommochrombildung.

Welche Aufgabe die Chinolinsäure zu erfüllen hat ist bis heute nicht klar. Die erhobenen Befunde widersprechen einander zum Teil (59, 60). So fanden HENDERSON und HIRSCH (47) in Leberschnitten und -homogenaten nach Zusatz von 3-Hydroxy-Anthranilsäure ziemlich viel Chinolinsäure, nicht aber nach Zugabe von Tryptophan oder Kynurenin. KREHL, BONNER und YANOFISKY (48) bestätigen dies, nehmen aber wegen der geringen Wachstumswirkung an, dass die Chinolinsäurebildung nur eine Seitenreaktion des Hauptweges darstellt. Untersuchungen an bestimmten *Neurospora*-stämmen, die Nikotinsäure zum Wachstum benötigen, führten zur Annahme eines Zwischenproduktes, das, aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure gebildet, sowohl Chinolsäure als auch Nikotinsäure liefern kann (49), da Chinolinsäure in erheblicher Menge nachweisbar war. Dieser Befund wurde erweitert dahingehend (50), dass ein *Neurospora*-stamm angenommen wurde, der Nikotinsäure und ihre Vorstufen für das Wachstum verwerten kann und neben Nikotinsäure auch Chinolinsäure zu bilden vermag, im Gegensatz zu einem anderen, der zwar Kynurenin in 3-Hydroxy-Anthranilsäure oder Chinolinsäure überzuführen vermag, nicht aber in Nikotinsäure. Dieser

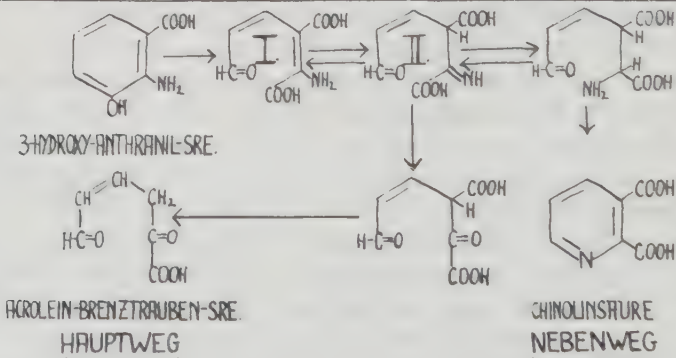
3-HYDROXY-ANTHRANIL-SRE-ABBAU NACH MEHLER.



3-HYDROXY-ANTHRANIL-SRE-ABBAU NACH WISS.



3-HYDROXY-ANTHRANIL-SRE-ABBAU NACH DALGLIESH.



Meinungen zur Chinolinsäurebildung
aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure

letzte Stamm soll ausserdem auch nicht die Fähigkeit besitzen, die Vorstufen der 3-Hydroxy-Anthranilsäure im Wachstumsversuch zu verwerten.

Im Tierversuch fand HENDERSON (51) Chinolinsäure im Harn von nikotinsäurefrei ernährten Ratten, die mit Tryptophan belastet worden waren. Er stellte jedoch fest (52), dass trotz seiner Annahme der Chinolinsäure als Zwischenprodukt des Abbaus ihr Wachstumseffekt auf nikotinsäurefrei ernährte Tiere ein viel geringerer war als der von 3-Hydroxy-Anthranilsäure oder von Tryptophan. Nachdem SCHWEIGERT und BOKMAN (53) ein chinonartiges Zwischenprodukt der Reaktion 3-Hydroxy-Anthranilsäure/Nikotinsäure bzw. Chinolinsäure gefunden hatten, versuchten sie eine Erklärung derselben: Aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure entstehe ein Chinon-Imin, welches einerseits ein Fumarsäurederivat bilden kann, andererseits unter Ammoniakabspaltung in einen stickstofffreien Chinonabkömmling übergehen kann, der wieder zu einem N-freien Kondensationsprodukt führe.

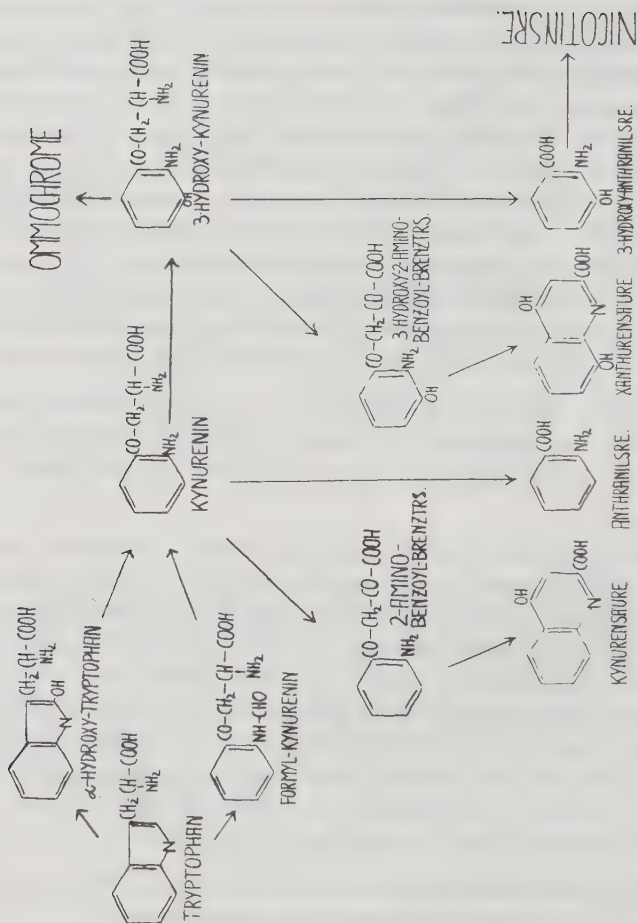
WISS (54) vertrat eine andere Auffassung: aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure entstehe primär auf oxydativem Weg Acrolein-Amino-Fumarsäure, die nach Umlagerung in ein Maleinsäurederivat zu Chinolinsäure dehydratisiert wird.

Schliesslich führte MEHLER (55) die Bildung des von SCHWEIGERT und BOKMAN (53) gefundenen Zwischenprodukts auf die Wirkung eines neuen Enzymsystems zurück; Ein Enzym I bilde zunächst ein instabiles Zwischenprodukt aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Aus diesem entstehe spontan ohne Enzymeinfluss Chinolinsäure einerseits, während andererseits unter der Einwirkung eines Enzyms II Picolinsäure gebildet werde. Dieses Enzym II baue Chinolinsäure nicht ab. Fraglich sei hierbei, ob ein Entstehungsmechanismus für alle aus der 3-Hydroxy-Anthranilsäure entstehenden Pyridinderivate gilt, oder ob die Nikotinsäure auf einem anderen Wege und unabhängig von Chinolinsäure und Picolinsäure gebildet wird.

(Zu den angegebenen Erklärungsversuchen siehe auch das beigegegebene Schema, das einen Vergleich der Ansichten ermöglichen soll.)

Obwohl die genannten Erklärungen auch durch objektive Befunde unterstrichen werden konnten, blieb die Frage einer Überführung von Chinolinsäure in Nikotinsäure unklar.

DALGLIESH (56) hielt es für möglich, dass Derivate von Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin die wirklichen Vorstufen für die Chinolinsäure dar-



Der Abbau des Tryptophans zur Nikotinsäure
und seine Nebenwege

stellen, und erklärte die geringe Aktivität des Stoffes durch eine begrenzte Überführung in diese Derivate. SCHWEIGERT und BOKMAN (53) fanden, dass in Rattenleberhomogenat 70 - 100 % Chinolinsäure aus Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin gebildet werden, dagegen nur 8 - 15 % bei intakten Tieren. DALGLIESH (57) wies nun darauf hin, dass hier offenbar noch ein anderer Abbau stattfinden muss. Indem er seiner Betrachtung die von WISS (54) formulierten Zwischenstufen zugrunde legte, wies er nach, dass sich Nikotinsäure aus diesen durch enzymatische Decarboxylierung bilden kann. Die Bildung von Chinolinsäure wäre nur ein Umweg. Die verschiedenen Ergebnisse an Rattenleberhomogenaten und am lebenden Tier erklärte er durch die Annahme noch empfindlicherer Enzyme im lebenden Organismus als es das isolierte 3-Hydroxy-Anthranilsäure spaltende Enzym (55) darstellt.

Erst in letzter Zeit gelang es WISS und BETTENDORF (58), das Zwischenprodukt des Abbaus 3-Hydroxy-Anthranilsäure/Nikotinsäure bzw. Chinolinsäure als primäres enzymatisches Spaltprodukt der 3-Hydroxy-Anthranilsäure zu isolieren. Es wurde diesem Stoff, im Sinne der früheren theoretischen Auffassung, die Struktur einer 1-Amino-4-Formyl-Butadien-(1,3)-Dikarbonsäure (1,2) zugeschrieben.

B. ANDERE ABBAUWEGE DES TRYPTOPHANS

Neben dem Abbau des Tryptophans zur Nikotinsäure und den damit verbundenen Seitenreaktionen sind andere Abbauwege bekannt: Die Bildung von 5-Hydroxy-Tryptamin und seiner Vorstufen, die Bildung von Indikan, die Bildung verschiedener Aminosäuren aus dem Tryptophan, die Bildung einer grösseren Zahl von Indolderivaten, für die Tryptophan als Ausgangsstoff angenommen wird. Welchen Umfang und welche Bedeutung diese Verwendungsmöglichkeiten des Tryptophans neben dem genannten Abbau zur Nikotinsäure besitzen ist heute noch weitgehend unklar. Auch muss in Frage gestellt sein, ob alle einen Indolring enthaltenden Stoffe Tryptophan als Ausgang oder zum Ziel haben müssen.

Aus der Zahl der Abbaureaktionen sei hier nur eine näher besprochen, welche für unsere Fragestellung von Interesse war.

Der Abbau zu 5-Hydroxy-Tryptophan und seinen Derivaten. Für den Abbau des Tryptophans zu 5-Hydroxy-Tryptamin (Serotonin, Enteramin) müssen zwei Möglichkeiten angenommen werden: Zunächst eine Bildung über die Zwischenstufe Tryptamin, ferner der Abbauweg Tryptophan -- 5-Hydroxy-Tryptophan -- 5-Hydroxy-Tryptamin. Dabei scheint der Weg über das 5-Hydroxy-Tryptophan der wahrscheinlichere zu sein. UDENFRIEND und Mitarbeiter (61) haben im Tiergewebe das Vorhandensein zweier Enzymsysteme festgestellt, welche zunächst die Oxydation des l-Tryptophans zu 5-Hydroxy-Tryptophan katalysieren und dann die Decarboxylierung des 5-Hydroxy-Tryptophans zu 5-Hydroxy-Tryptamin. Demnach unterscheidet man zwischen einer Tryptophan-Oxydase und einer 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase.

Die andere Möglichkeit der Bildung von 5-Hydroxy-Tryptamin aus Tryptamin bzw. Tryptophan unter Umgehung der Stufe des 5-Hydroxy-Tryptophans besteht nicht, da sich bis heute kein Anhalt für die Existenz einer Tryptamin-Oxydase im tierischen Gewebe finden liess.

5-Hydroxy-Tryptophan zeigt eine bemerkenswerte Stabilität gegen das kynureninbildende Enzym, wie EK und WITKOP gefunden haben (62), und damit wird die Möglichkeit eines andersartigen Abbaus als des zur Nikotinsäure und anderen Nebenprodukten begründet. Ausserdem fanden BEILER und MARTIN (63), dass 5-Hydroxy-Tryptophan-Decarboxylase durch verschiedene Substanzen inhibiert werden kann, besonders durch carbonylhaltige Stoffe und Chelat-Verbindungen. Die beiden Autoren nehmen an, dass ein Metall in dem Enzym enthalten ist, und dass Pyridoxalphosphat Coenzymfunktionen bei der Wirkung des Enzyms zukommen.

C. DIE TRYPTOPHANSYNTHESE

Um die prinzipielle Möglichkeit anzuführen, dass aus seinen Abbauprodukten Tryptophan auch wieder entstehen kann, sei hier kurz auf die Tryptophanbildung im biologischen Bereich eingegangen. Einschränkend muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass diese Ergebnisse ausschließlich an *Neurospora*- bzw. *Escheria-coli*-Kulturen und nicht bei Versuchen an Säugetieren gewonnen worden sind.

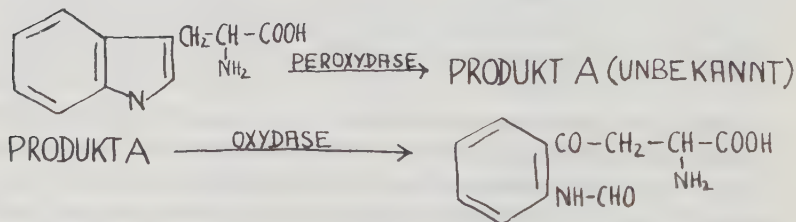
Als Bausteine der biologischen Tryptophansynthese wurden Indol und Serin verwendet, welche den Nährböden der Versuchskulturen zugesetzt wurden. YANOFSKY (65) zeigte jedoch, dass *Escheria coli* in Gegenwart von Ribose oder Ribosederivaten Indol aufzubauen vermag, so dass auch noch kleinere als die angeführten Bausteine für die Tryptophansynthese in Betracht gezogen werden müssen. TATUM und BONNER (64) fanden, dass Indol aus den Nährböden von *Neurospora* bedeutend schneller verschwindet, wenn Serin zugesetzt wird. Andere Aminosäuren blieben ohne Effekt auf die Tryptophanbildung, bei Verwendung von Serin wurde jedoch festgestellt, dass 30 - 50 % d. Th. an Tryptophan entstanden sind. Auf Grund der Versuche wurde angenommen, dass alles Indol in l-Tryptophan übergeführt wird, hiervon aber 50 - 70 % abgebaut werden. Als Nebenbefund ergab sich ausserdem, dass Indol-3-Essigsäure von *Neurospora* nur in Gegenwart von Tryptophan oder Indol + Serin produziert und ausgeschieden wird. YANOFSKY (69) kam zu den gleichen Ergebnissen, als er die Wirkung der Tryptophan-Desmolase (Indol - Tryptophan) an *Neurospora* mit zahlreichen Aminosäuren untersuchte. Auch er fand, dass Serin nicht zu ersetzen ist, ferner stellte er fest, dass Pyridoxalphosphat das Coenzym der Tryptophandesmolase ist. Tryptophan, Co^{2+} , Mn^{2+} , CN^- und Hydroxylamin wirken als Inhibitoren der Reaktion.

Die Synthese des Tryptophans aus Indol und Serin soll nach TATUM und SHEMIN (66) über die Aminoacrylsäure nach Wasserabspaltung aus dem Serin gehen. DALGLIESH (67) gibt eine allgemeine Biosynthese des Tryptophans mit den Stufen: Glukose -- Shikimisäure -- Zwischenstufe -- Tryptophan an. Für den Ausgangsstoff Glukose sprechen die Ergebnisse

von GIBSON (68). Danach kann *Escheria coli* aus Glucose und Ammoniumsalzen den Umsatz vollziehen und Indolringe bilden, allerdings in Gegenwart von Tryptophan.

D. DIE FERMENTE UND COFERMENTE DES TRYPTOPHANSTOFFWECHSELS

Tryptophan -- Formylkynurenin. Bei der Spaltung des Tryptophans zu dem bisher nicht isolierten Formylkynurenin soll ein Peroxydase/Oxydase-System (70) wirksam sein, welches in zwei Stufen zur Bildung des Formylkynurenins führen soll:

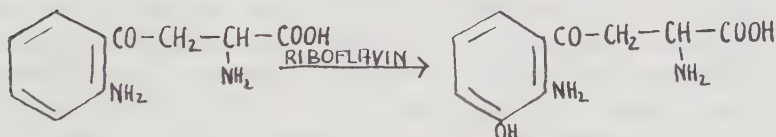


Auf diese Reaktion, besonders auf ihre erste Stufe, soll das Biotin in beschleunigendem Sinn Einfluss haben (71).

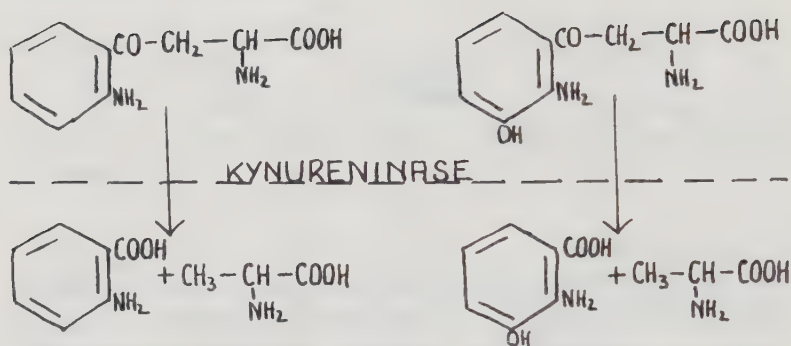
Formylkynurenin -- Kynurenin. Für den Übergang des Formylkynurenins in Kynurenin hat JAKOBY (72) an *Neurospora* eine Kynurenin-Formamidase gefunden, welche nicht nur Formylkynurenin in Kynurenin und Ameisensäure spaltet, sondern nach KNOX und MEHLER (73) auch Formyl-Anthranilsäure und Formyl-o-Aminoacetophenon zu spalten in der Lage ist.



Kynurenin -- 3-Hydroxy-Kynurenin. Die Oxydation von Kynurenin zu 3-Hydroxy-Kynurenin muss unmittelbar nach Öffnung des Indolringes erfolgen (74). Ein besonderes Fermentsystem ist hierfür nicht bekannt, die Reaktion soll jedoch durch Riboflavin katalysiert werden (76).

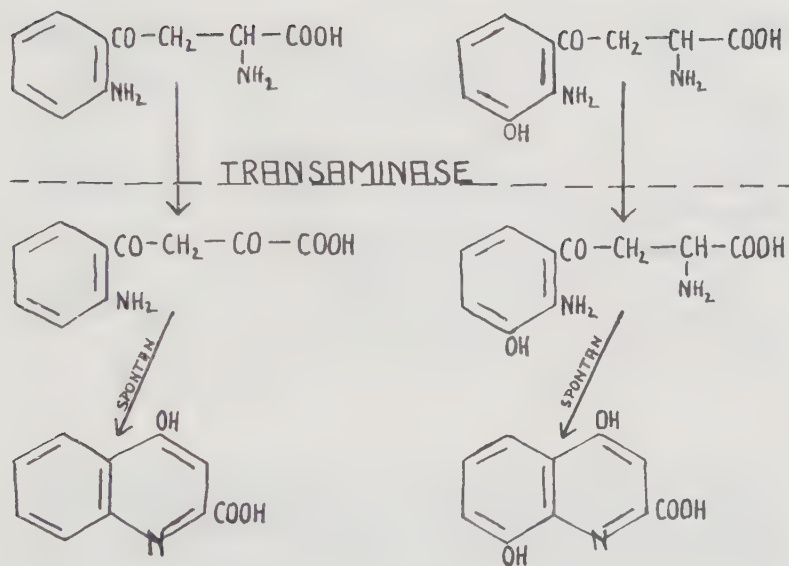


Spaltungsreaktion (Kynurenin -- Anthranilsäure + Alanin und 3-Hydroxy-Kynurenin -- 3-Hydroxy-Anthranilsäure + Alanin.) Das spaltende Ferment Kynureninase (74) wirkt nicht nur auf das Kynurenin ein, sondern spaltet in gleicher Weise das 3-Hydroxy-Kynurenin. In beiden Reaktionen entsteht als Nebenprodukt Alanin. Beide Reaktionen erfolgen in einem Schritt, benötigen Pyridoxalphosphat als Coferment und verlaufen nicht über die Zwischenstufe der o-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure.

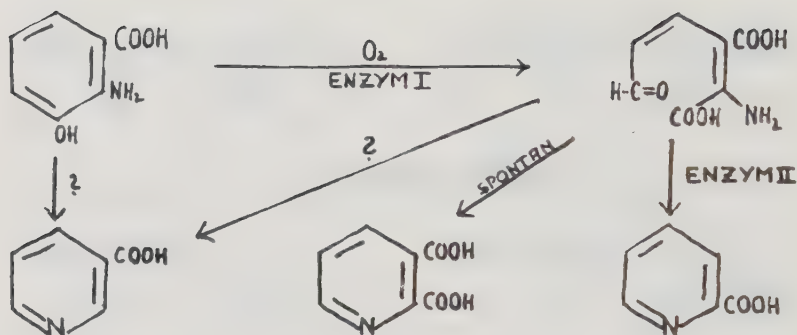


Cyklisierungsreaktion (Kynurenin -- Kynurensäure, 3-Hydroxy-Kynurenin -- Xanthurensäure.) Das hier wirksame Ferment Transaminase bildet zunächst aus dem Kynurenin o-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure und analog aus dem 3-Hydroxy-Kynurenin 3-Hydroxy-, 2-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure (74). Auch diese Reaktion benötigt Pyridoxalphosphat als Coferment, sowohl im Falle des Kynurenins als auch des 3-Hydroxy-Kynurenins. Ausserdem ist in beiden Reaktionen die Anwesenheit von α-Keto-Glutarsäure bzw. Brenztraubensäure bei der Transaminierung als Aminogruppenacceptor notwendig (75). Wichtig in diesem Zusammenhang erscheint die Feststellung von JAKOBY und BONNER (77), dass sich Pyridoxalphosphat als Coferment der Transaminase nicht durch Pyridoxin ersetzen lässt.

Die Bildung der Kynurensäure aus o-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure und die der Xanthurensäure aus 3-Hydroxy-, 2-Amino-Benzoyl-Brenztraubensäure soll nach WISS (75) wahrscheinlich ohne Enzymeinfluss, lediglich durch einfache Wasserabspaltung erfolgen.



3-Hydroxy-Anthranilsäure -- Nikotinsäure bzw. Chinolinsäure. Nach MEHLER (55) bildet ein cyanid-, aber nicht blausäureempfindliches Enzym I durch Oxydation aus der 3-Hydroxy-Anthranilsäure das von SCHWEIGERT und BOKMAN gefundene Zwischenprodukt (53). Ein Enzym II soll daraus in einer O_2 -unabhängigen, aber blausäureempfindlichen Reaktion Picolinsäure bilden. Eine Beteiligung irgendwelcher Cofermente an diesen beiden Reaktionen ist noch ebenso unbekannt wie die Reaktion, welche zur Bildung von Nikotinsäure führt. Drei Wege, ausgehend von 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Chinolinsäure und schliesslich von dem genannten Zwischenprodukt, werden diskutiert.



Dass den Cofermenten eine dirigierende Wirkung im Tryptophanstoffwechsel zukommt, zeigten verschiedene Tierversuche: Bei diesen Untersuchungen (78) wurde festgestellt, dass bei Ratten, die ein vitamin-B₆-armes Futter erhielten, einerseits die Kynureninausscheidung, andererseits die Ausscheidung an Xanthurensäure erhöht war. Ferner konnte gezeigt werden, dass bei vitamin-B₆-arm ernährten Tieren die Ausscheidung der Nikotinsäure bzw. ihrer Derivate nach Tryptophanbelastung im Gegensatz zu Normaltieren vermindert war (79). Bei Menschen (80) ergaben sich weniger eindeutige Befunde: HENDERSON (81) konnte feststellen, dass Vitamin B₆ und Riboflavin bei der Bildung der 3-Hydroxy-Anthranilsäure eine Rolle spielen. HURT, SCHEER und DEUEL (82) fanden eine Abhängigkeit der Nikotinsäurebildung in Leberschnitten von Vitamin-B₆-Zusatz, wenn Tryptophan zugegeben worden war. Lebern von vitamin-B₆-arm ernährten Tieren lieferten weniger Nikotinsäurederivate. HENDERSON, KOSKI und D'ANGELI (83) sahen bei Riboflavinmangel aus Tryptophan und Kynurenin weniger Chinolinsäure entstehen als aus 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Sie nahmen eine verminderte Oxydation zu 3-Hydroxy-Kynurenin bei Riboflavinmangel an. DALGLIESH, KNOX und NEUBERGER (84) glaubten, dass die Bildung der Xanthurensäure aus 3-Hydroxy-Kynurenin mit der Bildung von Nikotin-

säure über die 3-Hydroxy-Anthranilsäure reaktionsmechanisch gekoppelt seien. WISS (85) konnte dies widerlegen, indem er zeigte, dass sich diese beiden Reaktionswege in bestimmter Weise steuern lassen: Reine Enzympräparate nehmen nur denn den Weg der Xanthurensäurebildung, wenn α -Keto-Glutarsäure oder Brenztraubensäure zugesetzt werden. Nikotinsäurebildung findet dagegen bevorzugt statt, wenn Vitamin B₆, besonders in Form des Pyridoxal-5-Phosphats, vorhanden ist. An anderen Arbeiten, die sich mit der Coenzymwirkung befasst haben, seien folgende genannt: LEBKOVSKI (86) untersuchte die Pyridoxinwirkung, SCHWEIGERT (87) die des Riboflavins, der Pteroylglutaminsäure, HENDERSON (88) arbeitete mit Riboflavin und Pyridoxin, PORTER (89) mit Thiamin, Riboflavin und Pyridoxin. DALGLIESH (90) konnte an Ratten keine Biotinwirkung nachweisen, dagegen fand er eine Wirkung des Thiamins auf die erste Stufe der Peroxydase/Oxydase-Reaktion. Für Riboflavin nimmt dieser Verfasser eher eine phosphorylierende als eine oxydierende Wirkung an.

Auch andere Stoffe greifen in den Ablauf der Reaktionen ein: SCHWEIGERT (87) fand eine fördernde Wirkung durch Eisen²⁺-Ionen und Ascorbinsäure auf die Bildung von Chinolinsäure aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Auf die vermehrte Xanthurensäureausscheidung nach Fettfütterung sei hier nur hingewiesen.

E. DER TRYPTOPHANSTOFFWECHSEL BEIM MENSCHEN

Die an Tieren gewonnenen Erkenntnisse konnten jedoch nicht immer auch bei Menschen bestätigt werden. MUSAJO (91) gab einen allgemeinen Überblick über die diesbezüglichen Befunde, dem die folgenden Angaben entnommen sind:

1941 verabreichte KOTAKE Tryptophan an Tbc-Kranke. Im Harn der Patienten wies er Kynurenin nach, Gesunde zeigten jedoch keine Kynureninausscheidung nach Tryptophangabe. 1949 wurde an Patienten, die eine an Vitamin B₆ arme Nahrung erhalten hatten, eine Steigerung der

Xanthurensäureausscheidung festgestellt. Auch nach Gabe von Desoxypyridoxin wurde bei Vitamin-B₆-Mangel mehr Xanthurensäure ausgeschieden. Auf diesen Befunden aufbauend wurde direkt ein Test für den Vitamin-B₆-Mangel ausgearbeitet. Auf Grund dessen stellte man fest, dass in der Schwangerschaft eine erhöhte Xanthurensäureausscheidung vorliegt, welche durch Vitamin-B₆-Gabe beseitigt werden kann.

1951 wiederholten MUSAJO, SPADA und COPPINI die Tryptophanbelastungsversuche an Tbc-Kranken. Lungen-Tbc-Patienten wurden pro kg Körpergewicht 100 mg Tryptophan gegeben. Neben kleinen Mengen Kynuren- und Xanthurensäure wurden auch kleine Mengen 3-Hydroxy-Anthranilsäure im Harn gefunden, wobei letztere als Methylester isoliert wurden. Untersuchungen an Gesunden und Tbc-Kranken, die kein Tryptophan erhalten hatten, zeigten 3-Hydroxy-Anthranilsäure im Harn der Kranken, nicht aber in dem der gesunden Personen. Quantitative Versuche wurden nicht durchgeführt.

1955 stellten MUSAJO, BENASSI und PARPAJOLA Harnuntersuchungen an 194 Personen an, ohne sie mit Tryptophan zu belasten. 25 der Untersuchten waren gesund. Der übrige Kreis umfasste Tbc-Kranke, von denen die meisten eine geringe Ausscheidung von Kynuren- und Xanthurensäure zeigten, einige zusätzlich Kynurenin-Anthranilsäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Alle Gesunden und einige der Tbc-Kranken zeigten keinerlei Ausscheidungsprodukte im Harn. Die Autoren betonen die unsicheren und schwankenden Werte der Tryptophan-Ausscheidungsprodukte bei Tbc-Kranken, zufriedenstellend waren jedoch ähnliche Untersuchungen bei Leukämiepatienten:

21 dieser Kranken wurden untersucht. Bei allen fanden sich kleine Mengen Kynurensäure und Xanthurensäure im Harn, vor allem aber Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und konjugierte Derivate dieser beiden Verbindungen. Der Nachweis erfolgte papierchromatographisch, durch UV-Fluoreszenz und durch Vergleich mit synthetischen Produkten. (Soweit die Mitteilungen von MUSAJO.)

PERLZWEIG (92) stellte nach Tryptophangaben eine vermehrte Nikotinsäureausscheidung bei Säuglingen fest. MAKINO (93) verabreichte 5 g Tryptophan an Patienten mit schwerer, bilateraler Lungentuberkulose. Im Harn fand er einige Miligramm 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Bei zwei

nicht so schwer Erkrankten konnte er den genannten Stoff nicht feststellen. Bei Gabe von 3-Hydroxy-Anthranilsäure wurde lediglich eine Steigerung der Diazo-Reaktion im Harn festgestellt, sonst keine Untersuchung gemacht.

MUSAJO (94) untersuchte nochmals Harne von Gesunden und von Leukämie-Patienten. In einer Gruppe von 76 Personen fand er 59, die Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin ausschieden, 11 der Untersuchten hatten nur Kynurenin im Harn, 6 weder den einen noch den anderen Stoff. Die beiden Substanzen wurden in reiner Form aus den Harnen isoliert und mit Hilfe der UV-Untersuchung und chemischer Farbreaktionen identifiziert. Ferner wurde nochmals festgestellt, dass normaler Harn kein Kynurenin und kein 3-Hydroxy-Kynurenin enthält.

KOTAKE (95) fand bei Diabetes mellitus Kynurenin- und 3-Hydroxy-Kynureninausscheidung. DALGLIESH und TEKMAN (96) fügten diesen Beobachtungen eine wertvolle Ergänzung bei: Fiebernde Patienten scheiden oft im Harn 3-Hydroxy-Kynurenin aus. Die Verfasser sind der Meinung, dass diese Ausscheidung nicht gleichen Ursprungs ist wie die bei Diabetes mellitus oder Tuberkulose, sondern dass sie dem hohen Anteil abgebauten Körpereiwisses im fiebernden Körper entspricht. Für ihre Ansicht spricht, dass die 3-Hydroxy-Kynureninausscheidung sistiert, sobald das Fieber verschwindet. Bei künstlich erzeugtem Fieber, in Stadien des Gewichtsverlustes und in fieberfreiem Zustand war kein 3-Hydroxy-Kynurenin zu finden.

DALGLIESH (97) fand im Harn von Patienten mit verschiedenen Leukämien und Anämien eine Substanz mit fahlblauer Fluoreszenz. Auf Grund chemischer Farbreaktionen und durch Vergleich der Eigenschaften mit denen der reinen Testsubstanz konnte er diesen Stoff als 2-Amino-, 3-Hydroxy-Acetophenon (O-Sulfat) identifizieren. Dieser Stoff wird nach Untersuchungen des Verfassers auch im normalen Harn gefunden, etwa 1 mg/24 Stunden. Eine besondere Bedeutung bekamen die Tryptophanabbauprodukte durch die Untersuchungen von BOYLAND (98). Dieser stellte fest, dass o-Amino-Phenole eine cancerogene Wirkung bei Mäusen haben, denn er konnte damit an den Tieren Blasenkarzinome erzeugen. Da 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure zu der genannten Stoffgruppe gehören, wurden 10 Normalharne und 10 Harne Blasenkreiskranker papierchromatographisch untersucht. Dabei konnten im Harn

der Krebskranken 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure in höherer Konzentration als im Normalharn gefunden werden, ebenso Anthranilsäure und Kynurenin. Der Gehalt an schwefelsäureverestertem 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure-O-Sulfat war jedoch geringer als im Normalharn, was mit einer bei Krebskranken vermehrten Sulfatase erklärt wurde.

Während die Untersuchungen am Tier gemacht worden waren, um die grundsätzlichen Zusammenhänge des Tryptophanabbaus zu erkennen, zeigt obige Zusammenfassung, dass bei den Untersuchungen an Menschen das Interesse vor allem der Frage galt, ob ein Zusammenhang zwischen der Krankheit des Patienten und den im Harn nachweisbaren Metaboliten des Tryptophans besteht.

Mit systematischen Untersuchungen über den Tryptophanabbau bei Menschen und seine Abhängigkeit von Cofermenten haben sich in kleinem Umfang nur wenige Autoren befasst. Über die Veränderungen schliesslich, welche die Aminosäure im intermediären Stoffwechsel erfährt, über den Umfang ihrer Verwendung zur Eiweissynthese und über ihre Bedeutung für die Bildung anderer Zellbausteine ist noch sehr wenig bekannt, deshalb mag der Hinweis darauf genügen.

F. PROBLEMSTELLUNG DER ARBEIT

Die Durchsicht der Literatur liess uns erkennen, dass die heutigen Ansichten über den Tryptophanabbau im menschlichen Körper vor allem auf Versuchsbefunden beruhen, die an Tieren und *Neurospora*-Stämmen erhoben worden sind, zum geringsten Teil ist eine Nachprüfung am Menschen selbst durchgeführt worden. Dort, wo Tryptophan an Gesunde oder an Patienten verabreicht worden war, geschah dies in den seltensten Fällen zur Klärung des Tryptophanabbaus, weit öfter interessierte die Aufdeckung eines erhofften oder tatsächlichen Zusammenhanges zwischen der Tryptophanbelastung bzw. der nachfolgenden Metabolitenausscheidung und einem bestimmten Krankheitsbild.

Ein Gleiches gilt für die Cofermentwirksamkeit des Vitamins B_6 . Die Bedeutung dieses Wirkstoffes für den Abbau des Tryptophans ist in zahlreichen Tierversuchen eindeutig nachgewiesen und in wesentlichen Teilen geklärt worden. Es ist jedoch weitgehend unbekannt, ob für den menschlichen Organismus die am Tier gewonnenen Erkenntnisse Gültigkeit haben, da nur wenige Versuche in dieser Hinsicht gemacht worden sind.

Der gewonnenen Übersicht entsprechend stellten wir uns in der vorliegenden Arbeit die Aufgabe, den Abbau des Tryptophans im menschlichen Organismus qualitativ und so weit als möglich auch quantitativ zu untersuchen, wobei besonders der Abbau zur Nikotinsäure und seine Abhängigkeit vom Vitamin B_6 berücksichtigt werden sollte. Den eigentlichen Untersuchungen musste die Klärung einiger methodischer Fragen vorausgehen: Zunächst war zu klären, ob an Stelle einer oralen Gabe festen reinen Tryptophans eine intravenöse Applikation flüssiger Tryptophanderivate treten kann. Nachdem dies nicht möglich war, nahmen wir uns vor, die Metabolitenausscheidung nach oraler d-Tryptophangabe qualitativ zu untersuchen, um schliesslich in der Hauptuntersuchung aus wirtschaftlichen Gründen dl-Tryptophan verwenden zu können.

Im Rahmen unserer Arbeit sollte zunächst ein möglichst grosser Patientenkreis erfasst werden. Mit Hilfe der quantitativen Xanthurensäurebestimmung im Harn gedachten wir diesen in Stoffwechselgesunde und Patienten mit Vitamin- B_6 -Mangel zu teilen, ansonsten wollten wir nach einer einheitlichen Methodik in den Untersuchungen vorgehen.

Da die Untersuchungen bezüglich der Abbauprodukte des Tryptophans auf den Harn beschränkt bleiben mussten, wählten wir dafür folgende Gesichtspunkte:

- a) Welche Metaboliten des Tryptophans werden ausgeschieden?
- b) Wie gross ist die Gesamtzahl der verschiedenen zur Ausscheidung kommenden Metaboliten?
- c) Wie ist die Übereinstimmung mit den bisherigen Befunden?
- d) Wann tritt Xanthurensäure, wann 3-Hydroxy-Anthranilsäure bzw. Anthranilsäure auf?
- e) Wie verhalten sich die Flecke der übrigen Metaboliten auf dem PCG zum Fleck der Xanthurensäure bezüglich ihrer Grösse? (Halbquantitativer Vergleich.)
- f) Wann tritt Nicotinsäure bzw. eines ihrer Derivate auf und wie häufig ist ihr Vorkommen?

Um die Wirkung einer Vitamin-B₆-Behandlung auf den Abbau des Tryptophans nachweisen zu können schien es wünschenswert, möglichst viele Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel nach entsprechender Vitamin-Behandlung nochmals mit Tryptophan zu belasten und ihre Harne nach dem gleichen, vorher angegebenen Schema zu untersuchen.

Als weitere Frage wurde die Metabolitenvergleichbarkeit gewählt: Ein Vergleich der Papierchromatogramme sollte Unterschiede in der Metabolitenausscheidung bei den einzelnen Patientengruppen deutlich machen.

Mit Untersuchungen über die Dauer der Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten bei Stoffwechselgesunden und bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel sollten schliesslich die Versuche abgeschlossen werden.

Abweichungen, welche zwischen den Ergebnissen unserer Arbeit und den Aussagen anderer Autoren festgestellt wurden, machten es nach Abschluss der Versuche notwendig, nach methodischen Ursachen für die bestehenden Differenzen zu suchen. Deshalb wurde das bisher gebräuchlichste Verfahren der Harnuntersuchung in allen Einzelheiten nachgearbeitet und die damit gewonnenen Erfahrungen den Ergebnissen dieser Arbeit beigegeben.

UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE

A. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUFTRETEN VON METABOLITEN IM HARN NACH INJEKTION VON TRYPTOPHANDERIVATEN

Um die Applikation des Tryptophans zu erleichtern und zur Vermeidung individueller Unterschiede bei der Resorption der Aminosäure im Darm untersuchten wir zunächst, ob Tryptophan in gelöster Form als Tryptophanbernsteinsäureester intravenös verabreicht werden kann. In dieser Form gegebenes Tryptophan wurde gut vertragen, jedoch zeigte die papierchromatographische Untersuchung, dass der Ester nicht hydrolysiert wurde, sondern unverändert im Harn zur Ausscheidung kam. Wir konnten die Identität des harngelösten Stoffes mit dem reinen Tryptophanbernsteinsäureester nachweisen mit Hilfe des Papierchromatogramms, es gelang uns aber nicht, daneben irgendeinen der erwarteten Metaboliten aus dem Tryptophanabbau zu finden.

B. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUFTRETEN VON METABOLITEN IM HARN NACH ORALER BELASTUNG MIT D-TRYPTOPHAN

Die Erfahrungen mit dem intravenös verabreichten Tryptophanbernsteinsäureester veranlassten uns, bei allen weiteren Untersuchungen die Aminosäure nur noch oral zu applizieren. Aus wirtschaftlichen Gründen mussten wir jedoch dabei auf das dl-Tryptophan zurückgreifen, obwohl uns bekannt war, dass der überwiegende Anteil der mit dem Harn ausgeschiedenen Metaboliten dem Abbau des l-Tryptophans entstammen soll. Es war daher für uns zunächst von besonderem Interesse festzustellen, welche Abbaufolge die d-Form der Aminosäure durchläuft und welche Ab-

bauprodukte daraus gebildet werden, erst dann sollten Untersuchungen in grossem Umfang unter Verwendung des Racemats vorgenommen werden.

Zur Klärung unserer Frage erhielten vier Patienten je 2,5 g d-Tryptophan oral verabreicht, der Harn wurde bis zum Ende der 14. Stunde nach der Applikation gesammelt. Die Chromatogramme der Harnkonzentrate zeigten, dass alle vier Patienten ausser Tryptophan auch Kynurenin, Indol-3-Essigsäure, Indikan und eine uns unbekannte Substanz, die nach ihrem Reaktionsvermögen ebenfalls einen Indolring enthält, zur Ausscheidung brachten. Auf drei Chromatogrammen konnte ausserdem 5-Hydroxy-Tryptophan nachgewiesen werden. Eine der vier Harnproben enthielt sehr wenig Kynurenin, dafür aber wesentlich mehr Indol-3-Essigsäure und unbekannte Substanz als die übrigen drei. In Übereinstimmung mit älteren Untersuchungen wurde in keinem Falle 3-Hydroxy-Kynurenin, Xanthurensäure, Anthranilsäure oder 3-Hydroxy-Anthranilsäure gefunden. Wir konnten infolgedessen die Ansicht bestätigen, dass diese Stoffe aus der l-Form des Tryptophans gebildet werden. Die Entstehung von Kynurenin, Indol-3-Essigsäure, Indikan und einer unbekannten Substanz hatte für unsere Arbeit zur Konsequenz, bei der Verwendung von dl-Tryptophan wenigstens eine teilweise Bildung dieser Stoffe aus der d-Form des Racemats anzunehmen.

Ergänzend zu diesen Befunden sei bemerkt: Bei der Harnuntersuchung nach d-Tryptophangabe interessierte uns vor allem der qualitative Nachweis harnfähiger Metaboliten. Um auch sehr geringe Konzentration zu erfassen, wurden bei diesen Untersuchungen grössere Harnäquivalente chromatographiert als bei den folgenden.

C. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUFTRETEN VON METABOLITEN IM HARN NACH ORALER BELASTUNG MIT DL-TRYPTOPHAN BEI STOFFWECHSELGESUNDEN

Eine wichtige Voraussetzung für unsere Arbeit war die Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Stoffwechselgesunden und Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel. Wir verwendeten dazu die quantitative Xanthurensäurebestimmung in Harnproben nach Tryptophanbelastung. Diese wurde ne-

ben der papierchromatographischen Untersuchung bei jedem Patienten durchgeführt. Bezüglich der genauen Definition eines Vitamin-B₆-Mangels sei auf den folgenden Abschnitt (D.) verwiesen.

Von den insgesamt 168 mit dl-Tryptophan belasteten Patienten konnten wir 150 in unserem Sinne als stoffwechselgesund bezeichnen. Dass damit jedoch keineswegs eine vollständige Einheitlichkeit des papierchromatographischen Bildes in der Metabilitenausscheidung verknüpft ist, machten uns die Ergebnisse deutlich:

Der qualitative Nachweis im Harn enthaltener Metaboliten nach dl-Tryptophangabe zeigte, dass ausser Kynurenin, Indol-3-Essigsäure, Indikan und der unbekannten Substanz auch 3-Hydroxy-Anthraniisäure identifiziert werden konnten. Die bereits bekannte Gruppe harnfähiger Metaboliten des d-Tryptophans war somit durch Stoffe erweitert worden, welche nur als l-Tryptophan entstehen können. Weitere Aussagen über die Herkunft der einzelnen Abbauprodukte bzw. ihrer Bildung aus den beiden Formen des Racemats waren im Rahmen dieser Untersuchung nicht möglich.

Besonderes Interesse galt dem Nachweis der Nikotinsäure bzw. ihrer Derivate als den Endprodukten des Tryptophanabbaus. Obwohl wir mit sehr empfindlichen Methoden untersuchten, konnte in keinem einzigen Falle Nikotinsäure gefunden werden.

Die Gesamtzahl der ausgeschiedenen Metaboliten war bei den einzelnen Metaboliten verschieden. Dies wird allein schon durch die Zusammenstellung der gefundenen Abbauprodukte nach der Häufigkeit ihres Vorkommens deutlich.

Wir fanden:	Bei 150 Patienten	Tryptophan
"	147	" Kynurenin
"	126	" 3-Hydroxy-Kynurenin
"	125	" Indol-3-Essigsäure
"	124	" 3-Hydroxy-Anthraniisäure
"	119	" Unbekannte Substanz
"	115	" Xanthurensäure
"	40	" Indikan
"	28	" Anthraniisäure

Darüber hinaus ergaben sich weitere Unterschiede: Bei einer kleinen Gruppe Patienten liess sich ausser den wenigstens zum Teil aus d-Tryptophan entstandenen Substanzen Kynurenin und Indol-3-Essigsäure nur noch Tryptophan nachweisen. Umgekehrt konnten bei einer anderen, ebenfalls nur kleinen Gruppe alle in der obigen Zusammenstellung angeführten Metaboliten im Harn gefunden werden. Der grösste Teil der Untersuchten schied Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin, Xanthurensäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Indol-3-Essigsäure und die uns unbekannte Substanz aus.

Unter Berücksichtigung der Zugehörigkeit zu der d- bzw. l-Form des Tryptophans liess sich eine gewisse Ordnung erkennen: Bei Ausscheidung nur zweier Metaboliten konnten diese auf die d-Form zurückgeführt werden, während bei Urinen mit einem Gehalt von mehreren oder allen Metaboliten eine Beteiligung von d- und l-Tryptophan anzunehmen war.

Vergleich mit dem Schema des Tryptophanabbaus.

Wir machten dabei die Feststellung, dass die Reihenfolge der im Abbau des Tryptophans auftretenden Substanzen auch bei den auf den Chromatogrammen gefundenen Stoffen gewahrt blieb. Wenn beispielsweise 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Xanthurensäure auf dem Chromatogramm zu finden waren, fehlten auch Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin nicht. In keinem Falle wurde das Auftreten einer Substanz festgestellt ohne die gleichzeitige Anwesenheit der vorhergehenden Zwischenstufen.

Das Vorkommen von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Bemerkenswert war das fast immer gleichzeitige Auftreten von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure in den Harnkonzentraten stoffwechselgesunder Patienten. Aus der gegebenen Zusammenstellung ist ohne weiteres ersichtlich, dass in der überwiegenden Zahl der Fälle beide Stoffe gefunden wurden, während nur ein kleiner Teil der untersuchten Patienten eine 3-Hydroxy-Anthranilsäureausscheidung ohne gleichzeitige Anwesenheit von Xanthurensäure zeigte.

Das Auftreten von Anthranilsäure. Nur bei etwa einem Sechstel aller Stoffwechselgesunden konnten wir Anthranilsäure im Harn nachweisen. Neben deren Vorstufe Kynurenin fanden sich auch sämtliche anderen

Metaboliten: 3-Hydroxy-Kynurenin, Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure zusammen mit Indol-3-Essigsäure, Indikan und der unbekannten Substanz. Lediglich ein Patient machte insofern eine Ausnahme als sein Harn neben der Anthranilsäure weniger Abbaustoffe enthielt.

Halbquantitativer Mengenvergleich auf dem Chromatogramm. Bezüglich der Mengen ausgeschiedener Stoffe versuchten wir einen halbquantitativen Vergleich auf Grund der Fleckengrößen des Papierchromatogramms. Verwendet wurden dabei die im UV-Licht ausgewerteten Streifen. (Siehe dazu den methodischen Teil.) Wir berücksichtigten dabei die verschiedenen Konzentrationen der einzelnen Harnproben, entsprechend der gesammelten Harnmenge und dem verschiedenen Metabolitengehalt derselben. Deshalb wurden nur Metaboliten ein und desselben Chromatogramms betrachtet, wobei die Größe des Xanthurensäurefleckes die Vergleichsbasis bildete. Denn zu diesem Fleck war durch die quantitative Messung stets ein objektiver Wert vorhanden.

Es zeigte sich, dass Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin die kleinsten Flecke bildeten, zusammen mit Indikan. Etwa gleich gross mit dem Xanthurensäurefleck wurde im allgemeinen der Fleck von 3-Hydroxy-Anthranilsäure und der von Anthranilsäure gefunden, wenn letztere überhaupt vorhanden war. Indol-3-Essigsäure und die unbekannte Substanz waren bei Stoffwechselgesunden durch einen grösseren Fleck vertreten als die zugehörige Xanthurensäure.

D. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUFTRETEN VON METABOLITEN IM HARN NACH ORALER BELASTUNG MIT DL-TRYPTOPHAN BEI PATIENTEN MIT VITAMIN-B₆-MANGEL

Als Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel bezeichneten wir entsprechend einer früheren Mitteilung solche, die innerhalb von 12 bis 14 Stunden nach Gabe von 10 g dl-Tryptophan mehr als 50 mg und nach Gabe von 5 g der Aminosäure mehr als 25 mg Xanthurensäure mit dem Harn ausschieden. Die genannten Grenzwerte waren nach systematischen

Untersuchungen an einem grösseren Patientenkreis gewonnen und festgelegt worden (104).

Aus dem gesamten von uns untersuchten Harnmaterial konnten wir mit Hilfe der quantitativen Xanthurensäurebestimmung 18 Fälle sammeln, für die obige Definition zutreffend war. Die papierchromatographische Untersuchung erfolgte nach der gleichen Methodik wie bei den Harnen stoffwechselgesunder Patienten.

Der qualitative Nachweis neben Xanthurensäure vorkommender Metaboliten liess keinen Unterschied zu Stoffwechselgesunden erkennen: Wir fanden neben den Stoffen, die nach d-Tryptophanapplikation aufgetreten waren (Indol-3-Essigsäure, Kynurenin, Indikan und der unbekannten Substanz) auch die Abkömmlinge der l-Form des Tryptophans (3-Hydroxy-Kynurenin, Anthranilsäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Xanthurensäure selbst). Nikotinsäure oder eines ihrer Derivate liessen sich auch hier in keinem Fall nachweisen.

Die Gesamtzahl der ausgeschiedenen Metaboliten. Wie bei Stoffwechselgesunden stellten wir zunächst die gefundenen Stoffe nach der Häufigkeit ihres Vorkommens zusammen. Schon dabei fiel auf, dass nicht weniger als vier Stoffe bei allen 18 Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel nachweisbar waren, nämlich Tryptophan, Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und Xanthurensäure, während bei Stoffwechselgesunden nur das Tryptophan allen Chromatogrammen gemeinsam war. Wir fanden jedoch nicht einen Fall bei Vitamin-B₆-Mangel, der eine sehr kleine Metabolitenzahl aufzuweisen hatte.

Wir fanden:	Bei 18 Patienten	Tryptophan
"	18 "	Kynurenin
"	18 "	3-Hydroxy-Kynurenin
"	18 "	Xanthurensäure
"	17 "	Indol-3-Essigsäure
"	14 "	3-Hydroxy-Anthranilsäure
"	14 "	Unbekannte Substanz
"	7 "	Indikan
"	3 "	Anthranilsäure

Eine Unterteilung der Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel in verschiedene Gruppen nahmen wir nicht vor, da keine prinzipiellen Unterschiede in der Metabolitenverteilung gegenüber der bei stoffwechselgesunden Patienten gefunden wurden. Die geringste Anzahl der in einer Harnprobe enthaltenen Metaboliten war sechs. Alle anderen Sammelharnen enthielten eine grössere Zahl tryptophanabhängiger Bestandteile. Im Hinblick auf die Zugehörigkeit der einzelnen Stoffe zur d- oder l-Form des Tryptophans liess sich keine Bevorzugung der einen oder anderen Form feststellen: Während sich Abkömmlinge des l-Tryptophans (3-Hydroxy-Kynurenin und Xanthurensäure) in sämtlichen Harnkonzentraten fanden, konnten Kynurenin und Indol-3-Essigsäure, welche sicher auch aus d-Tryptophan entstehen, bis auf einen Fall stets nachgewiesen werden. 3-Hydroxy-Anthranilsäure und die unbekannte Substanz waren bei gleich vielen Patienten nachweisbar, obwohl sie von verschiedenen Formen des Tryptophans abhängen scheinen.

Vergleich mit dem Schema des Tryptophanabbaus. Ein Unterschied gegenüber den Verhältnissen bei Stoffwechselgesunden wurde nicht beobachtet: Die vermehrt ausgeschiedenen Xanthurensäuremengen waren stets von Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin begleitet. Auf keinem der Chromatogramme fand sich Xanthurensäure, ohne dass nicht auch die entsprechenden Vorstufen nachzuweisen waren. Ebenso verhielten sich auch die Anthranilsäure und die 3-Hydroxy-Anthranilsäure.

Das Vorkommen von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Aus der Untersuchung über den Nachweis von 3-Hydroxy-Anthranilsäure neben Xanthurensäure bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel konnten wir entnehmen, dass die Gleichzeitigkeit des Auftretens⁶ beider Stoffe keine Ausnahme darstellt, sondern für den grössten Teil der Untersuchten zutrifft. Nur vier Personen aus dieser Patientengruppe zeigten eine vermehrte Xanthurensäureausscheidung ohne nachweisbare Mengen von 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Es handelte sich dabei durchwegs um Patienten mit einer niederen Xanthurensäureausscheidung mit Werten von 40 - 50 mg Xanthurensäure nach Gabe von 10 g dl-Tryptophan.

Das Auftreten von Anthranilsäure. Es sei besonders auf das Vorkommen von Anthranilsäure bei Vitamin-B₆-Mangel hingewiesen. Nur bei einem Sechstel der untersuchten Patienten wurde dieser Stoff im Harn gefunden. War darin schon eine Übereinstimmung mit dem Verhalten stoffwechselgesunder Patienten festzustellen, dann erst recht bezüglich der übrigen, neben Anthranilsäure im Harn nachweisbaren Stoffe. Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin, Xanthurensäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Indol-3-Essigsäure, Indikan und die unbekannte Substanz waren in allen Harnproben mit Anthranilsäuregehalt anwesend.

Der halbquantitative Mengenvergleich auf dem Chromatogramm. Unter bewusster Beibehaltung unserer Vergleichsmethode bei der chromatographischen Auswertung versuchten wir auch bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel Aussagen über die Konzentration harnfähiger Metaboliten zu machen. Obwohl der Gehalt an Stoffen in den einzelnen Harnproben entsprechend der gesammelten Harnmenge und der Konzentration verschieden war, konnten wir doch feststellen, dass in den meisten Fällen mit vermehrter Xanthurensäureausscheidung auch ein grösserer Fleck auf dem Chromatogramm gefunden wurde. Nur sehr geringe Xanthurensäurekonzentrationen im Harn, bedingt durch die Ausscheidung einer erhöhten Xanthurensäuremenge in überdurchschnittlich viel Flüssigkeit, machten hiervon eine Ausnahme.

Bei dem Vergleich der übrigen Metabolitenflecken mit dem der Xanthurensäure fanden wir, dass eine allgemeine Fleckenvergrösserung zu beobachten war, was uns eine grössere Konzentration auch dieser Stoffe, nicht nur der Xanthurensäure, im Zustand eines Vitamin-B₆-Mangels annehmen liess. Das Verhältnis der Fleckengrössen wurde dadurch nicht verändert: Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin zeigten stets die kleinste Ausdehnung, etwas grösser fanden wir den Indikanfleck. Der Fleck der 3-Hydroxy-Anthranilsäure entsprach in den meisten Fällen dem der Xanthurensäure, ähnlich verhielt sich die Anthranilsäure. Die Flecken der Indol-3-Essigsäure und der unbekannten Substanz erschienen grösser als der der Xanthurensäure.

Zusammenfassend stellten wir fest: Bei annähernd gleicher Verteilung von Tryptophanmetaboliten wurden im Harn von Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel regelmässig grössere Mengen von allen Substanzen als bei Stoffwechselgesunden gefunden. Eine bevorzugte Ausscheidung einzelner Substanzen, z.B. der Xanthurensäure, wurde nicht beobachtet.

E. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS AUFTRETEN VON METABOLITEN IM HARN VON VITAMIN-B₆-MANGEL-PATIENTEN NACH NOCHMALIGER BELASTUNG MIT DL-TRYPTOPHAN UND BEI VITAMIN-B₆-BEHANDLUNG

Eine Gruppe von vier Patienten, bei denen nach dl-Tryptophangabe eine vermehrte Xanthurensäureausscheidung infolge eines Vitamin-B₆-Mangels festgestellt werden konnte, wurde eine Woche lang mit täglich 100 mg Vitamin B₆ in Form von Benadon behandelt. Anschliessend wurde nochmals mit je 10 g dl-Tryptophan belastet und der Harn papierchromatographisch untersucht.

Der qualitative Nachweis. Wir fanden folgende Metaboliten auf den Harnchromatogrammen: Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin, Anthranilsäure, Xanthurensäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Indol-3-Essigsäure, Indikan und die unbekannte Substanz. Nikotinsäure oder eines ihrer Derivate konnten wir nicht nachweisen, dagegen konnte bei allen vier Patienten Vitamin B₆ nachgewiesen werden. Dieses wurde im Harn chromatographisch als Pyridoxin identifiziert.

Die Gesamtzahl der ausgeschiedenen Metaboliten erwies sich bei den vier Patienten als ziemlich konstant. In zwei Fällen fehlte die Anthranilsäure auf dem Chromatogramm, im Harn eines Patienten der Indikan. Alle anderen tryptophanbedingten Stoffe waren in jedem dieser Harne enthalten. Nur der Vollständigkeit halber sei bemerkt, dass keine bevorzugte Ausscheidung d- bzw. l-Form zugehöriger Stoffe festzustellen war.

Der Vergleich mit dem Schema des Tryptophanabbaus. Er brachte nur die Bestätigung der früheren Befunde an den beiden voruntersuchten Gruppen: Sämtliche Zwischenstufen des Abbaus konnten lückenlos nachgewiesen werden.

Das Vorkommen von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure. In Bezug auf das gleichzeitige Auftreten von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure stellte sich heraus, dass die Verabreichung von Vitamin B₆ an Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel zu keiner Änderung der qualitativen Verhältnisse führt. Die vier Harnportionen enthielten durchgehend Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure nebeneinander.

Die Xanthurensäureausscheidung. Wie bei allen anderen Belastungen mit dl-Tryptophan bestimmten wir auch in den Harnen der mit Vitamin B₆ behandelten Patienten die Xanthurensäure quantitativ. Bei sämtlichen vier Personen, die im ersten Belastungsversuch eine erhöhte Xanthurensäureausscheidung aufzuweisen hatten, wurde nun eine Verminderung derselben auf den Normalbereich festgestellt. In einem der vier beobachteten Fälle war die Xanthurensäurekonzentration des Harnes bis unter die Schwelle der Messbarkeit herabgesunken.

Der halbquantitative Mengenvergleich auf dem Chromatogramm wurde auch hier und in gleicher Weise wie oben ausführlich beschrieben angestellt. In guter Übereinstimmung mit den quantitativen Werten zeigten sich die Xanthurensäureflecke auf keinem der vier Streifen grösser als bei Stoffwechselgesunden. Ihnen entsprachen auch die Fleckengrößen der übrigen Metaboliten. Hätte nicht der Fleck des Pyridoxins die Chromatogramme verändert, sie wären von denen stoffwechselgesunder Personen nicht zu unterscheiden gewesen, was die Grösse der einzelnen Metabolitenflecke anbetrifft.

Ausser den vier genannten Patienten wurden im Rahmen unserer Belastungsversuche noch weitere vier Personen erfasst, die aus therapeutischen Gründen Benadon verabreicht bekommen hatten.

Die Ergebnisse der papierchromatographischen Harnuntersuchung dieser Patienten nach Gabe von dl-Tryptophan und die Werte der Xanthurensäurebestimmung stimmten mit den bei stoffwechselgesunden Patienten festgestellten Ergebnissen voll überein, von der zusätzlichen Pyridoxinausscheidung abgesehen. Denn es wurden bei allen vier Personen Chromatogramme erzielt, die weder in der Anzahl der ausgeschiedenen Metaboliten und ihrer

Fleckengrösse, noch in der qualitativen Zusammensetzung der Stoffe ein andersartiges Verhalten zeigten.

Im Ganzen gesehen bewirkt eine Vitamin-B₆-Behandlung also nicht nur eine Normalisierung der Xanthurensäurewerte im Harn, sondern auch eine Verminderung der Konzentrationen sämtlicher nach Tryptophangabe auftretender Stoffe.

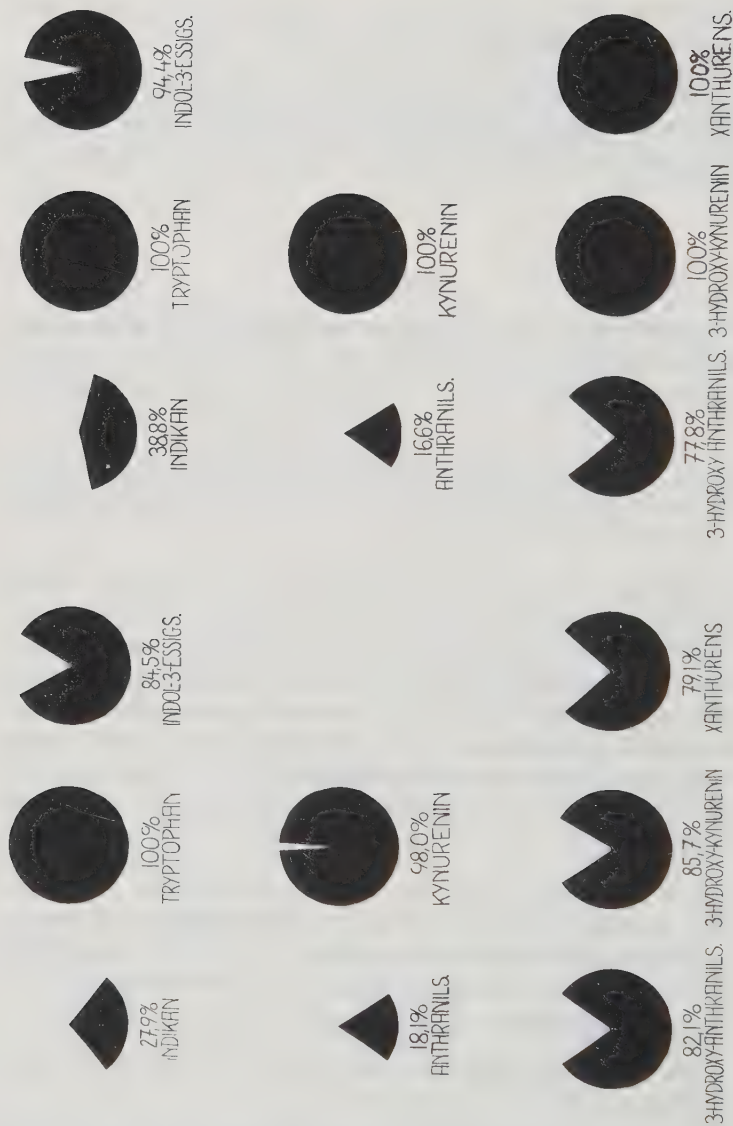
F. VERGLEICH DER METABOLITENAUSSCHEIDUNG IM HARN VON STOFFWECHSELGESUNDEN UND VON PATIENTEN MIT VITAMIN-B₆-MANGEL NACH ORALER BELASTUNG MIT DL-TRYPTOPHAN

Ein Vergleich der Ausscheidung von Metaboliten bei Stoffwechselgesunden und bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel nach Tryptophangabe zeigt folgende Unterschiede:

- 1) Die Zahl der ausgeschiedenen Metaboliten ist verschieden. Während bei Stoffwechselgesunden eine kleine Patientengruppe festgestellt werden konnte, bei der neben Tryptophan nur Kynurenin und Indol-3-Essigsäure ausgeschieden wurde, war dies bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel nie der Fall. Hier betrug die Mindestzahl der nachweisbaren Metaboliten sechs, alle anderen Harnkonzentrate hatten grössere Metabolitenzahlen aufzuweisen. Die absolute Zahl der Metaboliten war also bei Vitamin-B₆-Mangel-Patienten häufig bedeutend grösser.
- 2) Es wurde ein Unterschied in der ausgeschiedenen Menge der einzelnen Stoffe gefunden. Wenn auch die angestellten halbquantitativen Vergleiche nur in Grenzen bewertet werden dürfen, machten sie doch deutlich, dass bei einer vermehrten Xanthurensäureausscheidung auch die anderen Metaboliten vermehrt im Harn auftreten.

Auf der anderen Seite wurde eine prinzipielle Übereinstimmung in folgenden Punkten gefunden:

- 1) Der qualitative Nachweis der harnfähigen Metaboliten zeigte, dass beide Patientengruppen nach Belastung mit dl-Tryptophan die gleichen Metaboliten ausscheiden.



- 2) Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel zeigen ebenso wie Stoffwechsel-gesunde sowohl Metaboliten, die sich von der d-Form des Tryptophans herleiten, wie auch solche, die aus der l-Form der Aminosäure gebildet werden.
- 3) In keinem Fall konnten wir eine Ausscheidung von Nikotinsäure oder einem ihrer Derivate feststellen.
- 4) Der Vergleich der ausgeschiedenen Stoffe mit dem bekannten Abbau-schemata zeigte, dass die Reihenfolge der Abbaustufen fast immer lückenlos gewahrt wird.
- 5) Bei Stoffwechselgesunden wie bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel wurde in den meisten Fällen ein gleichzeitiges Vorkommen von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure beobachtet, wobei die Fleckengrößen der beiden Stoffe einander etwa entsprachen. Bei Vitamin-B₆-Mangel liess sich im Ganzen gesehen Xanthurensäure etwas häufiger als 3-Hydroxy-Anthranilsäure nachweisen, stoffwechsel-gesunde Personen zeigten ein umgekehrtes Verhalten.
- 6) Das Auftreten von Anthranilsäure war bei Vitamin-B₆-Mangel-Patienten fast ebenso selten zu bemerken wie bei den Personen mit normaler Metabolitenausscheidung. Harn, in denen Anthranilsäure zu finden war, enthielten meistens auch sämtliche anderen Abbauprodukte, einschliesslich Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten bei Vitamin-B₆-Mangel sich von dem Verhalten Stoffwechselgesunder im wesentlichen nur durch die vermehrte Konzentration aller Stoffe im Harn unterscheidet. Irgendwelche qualitativen Veränderungen im Verhältnis der vorkommenden Substanzen zueinander treten nicht auf.

Unseren Vergleich ergänzend, stellen nebenstehende Schemata das Vorkommen der Tryptophanmetaboliten im Harn Stoffwechselgesunder (Abb. A) und im Harn von Vitamin-B₆-Mangel-Patienten (Abb. B) graphisch dar. Die enthaltenen Zahlen geben an, bei wieviel Prozent der Patienten die einzelnen Stoffe nachzuweisen waren, wobei in Abb. A 150 Stoffwechsel-gesunde, in Abb. 18 Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel = 100 Prozent gesetzt wurden. Die Gegenüberstellung der Schemata zeigt nicht nur deutlich eine Zunahme in der Häufigkeit der Ausscheidung für die mei-

sten Metaboliten im Zustand eines Vitamin-B₆-Mangels sondern zugleich, welche Stoffe dabei besonders begünstigt bzw. gegenüber Stoffwechselgesunden weniger häufig ausgeschieden werden.

G. VERGLEICH DER METABOLITENAUSSCHEIDUNG IM HARN VON STOFFWECHSELGESUNDEN UND VON PATIENTEN MIT VITAMIN-B₆-MANGEL NACH VITAMIN-B₆-BEHANDLUNG UND NOCHMALIGER BELASTUNG

Es darf hier vorweg genommen sein, dass sich die Ergebnisse aus den Untersuchungen dieser beiden Patientengruppen nur durch die zusätzliche Ausscheidung von Vitamin B₆ (Pyridoxin) bei den damit behandelten Vitamin-B₆-Mangel-Patienten unterscheiden.

In allen anderen Befunden gleichen sich die beiden Gruppen vollkommen: Die Gesamtzahl der ausgeschiedenen Abbauprodukte zeigte keine Differenzen, d- und l-Form des Tryptophans hatten in gleicher Weise Anteil an der Metabolitenausscheidung, in keinem Falle konnte das Fehlen einer für die Vollständigkeit der Abbaureihe notwendigen Zwischenstufe festgestellt werden. Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure liessen sich bei den nachbehandelten Vitamin-B₆-Mangel-Patienten ebenso nebeneinander nachweisen wie auf den meisten Chromatogrammen Stoffwechselgesunder. Darüber hinaus entsprach der sichtbar gemachte Xanthurensäurefleck in seiner Grösse nicht nur dem der zugehörigen 3-Hydroxy-Anthranilsäure, sondern war auch Xanthurensäureflecken stoffwechselgesunder Patienten grössenmässig vergleichbar.

Durch Vitamin-B₆-Gabe wurde also eine vollständige Normalisierung des bei Vitamin-B₆-Mangel erhobenen Befundes erzielt.

H. UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE DAUER DER AUSSCHIEDUNG VON METABOLITEN NACH DL-TRYPTOPHANGABE BEI STOFFWECHSELGESUNDEN UND BEI PATIENTEN MIT EINEM VITAMIN-B₆-MANGEL

Um festzustellen, innerhalb welcher Zeit der Hauptanteil der Abbauprodukte im Harn erscheint, haben wir bei einem Teil der stoffwechselgesunden Patienten und bei Personen mit Vitamin-B₆-Mangel nicht nur den Harn der ersten 12 - 14 Stunden, sondern auch eine zweite Harnmenge bis zum Ende der 24. Stunde nach Applikation des Tryptophans gesammelt.

Xanthurensäure in zwei aufeinanderfolgenden Harnportionen

Gruppe I					
Erste Portion von 18 ⁰⁰ - 8 ⁰⁰ .			Zweite Portion von 8 ⁰⁰ - 18 ⁰⁰ .		
Patient	1. Harnportion	2. Harnportion	Patient	1. Harnportion	2. Harnportion
Sch.	96	5	Pa.	17	0
Schö.	10	6	Kl.	146	6
Gr.	12	6	Sp.	19	3
Schu.	47	10	Va.	27	0
Gö.	34	4	Ni.	29	5
Ko.	42	0			

Gruppe II					
Erste Portion von 9 ⁰⁰ - 19 ⁰⁰ .			Zweite Portion von 19 ⁰⁰ - 9 ⁰⁰ .		
Patient	1. Harnportion	2. Harnportion	Patient	1. Harnportion	2. Harnportion
Schr.	38	9	Ju.	13	10
Be.	29	14	Wi.	54	12
Ge.	29	6	Lan.	60	18
La.	68	15	En.	32	13
Wu.	29	11	Ma.	21	5

Bei diesen Untersuchungen lernten wir den Einfluss der Tageszeit auf die Metabolitenausscheidung nach Tryptophanbelastung kennen. Patienten, die am Morgen Tryptophan erhalten hatten, zeigten schon im Erstharn viel geringere Stoffkonzentrationen als solche, die nach dem Abendessen belastet worden waren. Bei Belastung am Morgen erwies sich in manchen Fällen die zweite Harnportion (14. - 24. Stunde) als praktisch metabolfrei. Auf Grund dieser Erfahrung und der Ergebnisse der quantitativen Xanthurensäurebestimmung (siehe dazu nebenstehende Tabelle) beschränkten wir uns auf die abendliche Applikation des Tryptophans, sodass der Nachturin stets die erste Harnportion in unseren Untersuchungen darstellte.

Wir berichten zunächst über die Metabolitenausscheidung bei 30 stoffwechselgesunden Patienten: Bei diesen enthielt die zweite Harnportion keine anderen Metaboliten als die, welche wir in der ersten Harnmenge nachweisen konnten. Hinsichtlich der Anzahl enthaltener Tryptophanabkömmlinge liessen sich gewisse Unterschiede feststellen: Bei 11 der Untersuchten fand sich im Zweitharn die gleiche Metabolitenzahl wie im ersten, wenn auch in wesentlich geringeren Mengen. 16 Patienten zeigten im Zweitharn eine Verminderung der Metabolitenzahl, nur in drei Fällen konnten wir in der zweiten Harnmenge eher eine Vermehrung der Anzahl verschiedener Stoffe gegenüber der ersten feststellen.

Bezüglich der Konzentration wurde in Fällen annähernd gleicher Harnmengen festgestellt, dass bei gleicher oder verminderter Metabolitenzahl im Zweitharn eine bedeutende Abnahme der Stoffmengen und damit eine Verkleinerung der Chromatogrammeflecke auftritt. Der wesentlich geringere Xanthurensäurewert der quantitativen Bestimmung im Zweitharn bestätigte den subjektiven Befund.

Die Verminderung der Metabolitenzahl geschah stets auf Kosten von Indol-3-Essigsäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure und der unbekannten Substanz. Nur in wenigen Fällen war auch keine Xanthurensäure nachweisbar. Eine Vermehrung der Metabolitenzahl betraf lediglich den Indikan, welcher als zusätzlicher Stoff in der zweiten Harnportion auftrat. Leider konnten wir die betreffenden drei Zweitharne nicht zu einem Vergleich verwenden, da die Harnmengen von erster und zweiter Sammelportion allzu verschieden waren.

Gleiche Untersuchungen wie bei Stoffwechselgesunden wurden auch an sieben Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel gemacht. Auch in den

Zweitharnen dieser Personen fand sich kein Unterschied in der Metabolitenausscheidung gegenüber dem ersten Sammelharn, denn es traten die gleichen Stoffe auf. Es zeigten aber nur zwei der untersuchten Patienten im Zweitharn die gleiche Anzahl Abbauprodukte wie im ersten, die restlichen fünf Harnе wiesen weniger Metaboliten in der zweiten Portion auf.

Hinsichtlich der Fleckengrösse war bei annähernd gleichen Harnmengen eine Verkleinerung der Flecke von Indol-3-Essigsäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Xanthurensäure und der unbekannten Substanz festzustellen. Dagegen zeigten sich die Flecke von Tryptophan, Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und Indikan auf dem Chromatogramm des Zweitharnes praktisch gleich gross.

Zusammenfassend konnten wir feststellen, dass bei abendlicher Applikation des Tryptophans Stoffwechselgesunde und Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel innerhalb der ersten 12 - 14 Stunden die weitaus grösste Menge und die grösste Anzahl an Metaboliten mit dem Harn ausscheiden.

I. METHODISCHE PROBLEME

1) Die Untersuchung des Harnes unbelasteter Patienten. Um zu klären, ob auch ohne vorherige Tryptophangabe Metaboliten im Harn enthalten sind, untersuchten wir 10 Harnе von Patienten mit verschiedenen Krankheitsbildern, unter anderem auch von Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel. Wir konnten in keinem Fall eine Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten feststellen, ausgenommen ist hiervon nur der Indikan. Es traten lediglich Aminosäuren auf, wie sie auch nach Tryptophan neben dessen Metaboliten im Harn gefunden wurden.

2) Untersuchung des Harnpräzipitates. Wir verwendeten bei der Herstellung der Harnkonzentrate die von WISS und HELLMANN (105) angegebene Methode. Ihr Prinzip beruht auf der Trennung der im Harn enthaltenen Stoffe durch Acetonzusatz: Während Eiweisskörper, Schleimstoffe und vor allem Salze dadurch gefällt werden, bleiben Harnstoff,

Harnsäure, Aminosäuren und nicht zuletzt die Metaboliten des Tryptophans in Lösung. Man trennt vom Niederschlag und verwendet die eingeeengte Lösung für die Papierchromatographie.

Um den Verlust von Metaboliten ausschliessen zu können untersuchten wir das Sediment nach Aufschlammung in einem Eisessig/Wassergemisch = 1 : 10. Auf dem Chromatogramm konnten wir entweder gar keine oder nur geringe Spuren von Abbaustoffen des Tryptophans feststellen.

3) Die Methode der Harnuntersuchung nach DAGLIESH. Wir untersuchten dieses bisher gebräuchlichste Anreicherungsverfahren für harngelöste Stoffe, um die damit gewonnenen Ergebnisse mit unseren vergleichen zu können. Das Prinzip der Methode ist folgendes: Stoffe, die einen Benzol- oder Indolring enthalten, werden selektiv an präparierte Aktivkohle adsorbiert. Dadurch können sie von anderen Harnbestandteilen getrennt werden. Die Lösung der Phenol- und Indolkörper von der Kohle erfolgt mit wässriger Phenollösung. Bei der anschliessenden Destillation wird diese nicht nur eingeeengt, sondern zugleich das Phenol daraus entfernt. Der Rückstand enthält die zu untersuchenden Harnbestandteile und wird für die Papierchromatographie verwendet.

Um festzustellen, ob und in welchem Mass Metaboliten bei Anreicherung mit Hilfe dieser Methode verloren gehen, wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

- a. Zunächst stellten wir fest, dass bei der Vakuum-Destillation eines Gemisches aus 80 ml Harn und 8 ml Essigsäure, in dem je 80 mg 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Nikotinsäure gelöst waren, 3-Hydroxy-Anthranilsäure in erheblicher Menge mit dem Wasserdampf überging. Dagegen enthielt die Vorlage keine Nikotinsäure. Der Nachweis erfolgte rein qualitativ auf dem PCG.
- b. In einem weiteren Versuch wurde ein Harn/Essigsäuregemisch (75 : 7,5 ml) als Lösungsmittel für 75 mg 3-Hydroxy-Anthranilsäure verwendet und die Lösung genau nach dem Verfahren von DALGLIESH (99) verarbeitet. Die vorbehandelte Aktivkohle und das Phenolgemisch wurden ebenfalls nach den Angaben des Verfassers hergestellt, wobei die angegebenen Bedingungen genau eingehalten wurden. Ver-

braucht wurden hierbei 3 g Kohle und 70 ml Phenolgemisch, die Destillation erfolgte mittels Vakuum bei 22 mm Hg. Im Destillat konnte keine 3-Hydroxy-Anthranilsäure nachgewiesen werden. Aus der Kohle jedoch, die bereits mit Phenolgemisch und Wasser eluiert worden war, konnten mit Hilfe von 150 ml 96%igem Alkohol, 38,8 mg Festschubstanz gewonnen werden. Das Papierchromatogramm ergab vorwiegend 3-Hydroxy-Anthranilsäure als Bestandteil, daneben etwas Harnstoff und Harnsäure.

- c. Einen dritten Versuch machten wir mit dem Harn eines Stoffwechselgesunden, der 10 g dl-Tryptophan erhalten hatte. 100 ml dieses Urins wurden wiederum genau nach der Methode von DALGLIESH untersucht, daneben parallel unser Verfahren angewendet und die Ergebnisse verglichen. Für die DALGLIESH-Methode wurden 3 g Kohle und 100 ml Phenolgemisch verwendet, die Destillation erfolgte bei 20 mm Hg und einer maximalen Dampftemperatur von 47 °C, die Konzentration betrug 6 ml.

Wegen des unterschiedlichen Gehaltes der Konzentrate konnten wir die Chromatogramme beider Verfahren nur hinsichtlich der Metabolitenzahl, nicht aber bezüglich der Fleckengröße miteinander vergleichen.

Das andere Verfahren zeigte gegenüber unserem eine Verminderung der Metabolitenzahl. Es fehlten die unbekannte Substanz, der Indikan und die nicht dem Tryptophan zugehörigen Aminosäuren. Auf den letzten Befund hat DALGLIESH bereits selbst hingewiesen. Harnsäure lieferten beide Verfahren, Harnstoff dagegen war nur in unserer Harnkonzentrierung erhalten geblieben. Tryptophan, Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin, Xanthurensäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Indol-3-Essigsäure waren in beiden Konzentraten vorhanden.

Bei einer Betrachtung der Fleckengrößen hatten wir den Eindruck, dass der Umweg über die Aktivkohle zu einer Verschiebung der Mengenverhältnisse führt: Die Flecken von Indol-3-Essigsäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure und der unbekannten Substanz waren nach dem Eluieren und Konzentrieren der Metaboliten im Chromatogramm kleiner erschienen als bei der direkten Harneinengung, wie wir sie vorzunehmen pflegten.

Die Nachbehandlung des Kohlerückstandes mit 96 %igem Alkohol konnte dies bestätigen, denn wir fanden in dem alkoholischen, eingeeengten Extrakt erhebliche Mengen sämtlicher Metaboliten, einschliesslich Indikan und der unbekannten Substanz. Auch Harnstoff und Harnsäure waren vorhanden.

- d. Schliesslich erhielten zwei Patientinnen mit Schwangerschaftsnephropathie dl-Tryptophan, da wir hier sicher mit einer vermehrten Ausscheidung von Xanthurensäure nach Belastung rechnen konnten. Beide Harne wurden parallel nach dem Verfahren von DALGLIESH und nach unserer Methode untersucht, die Xanthurensäure im Harn quantitativ bestimmt. Für die Chromatographie nach dem DALGLIESH-Verfahren wurden in beiden Fällen Gemische aus 100 ml Harn und 10 ml Essigsäure verwendet. Für eine Harnprobe genügten 3,5 g Kohle zur Entfärbung und 100 ml Phenolgemisch bei der Elution, bei der anderen mussten wegen der hohen Konzentration 6 g Kohle und 150 ml Phenollösung verwendet werden. Die Vakuum-Destillation erfolgte in beiden Fällen bei 22 mm Hg.

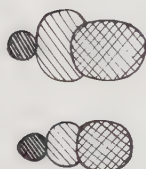
Ein Vergleich der angefertigten Chromatogramme ergab: Beide Patientinnen liessen nach Tryptophanbelastung eine grosse Anzahl Tryptophanmetaboliten im Harn. Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin, Xanthurensäure, 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Indol-3-Essigsäure, Indikan und die unbekannte Substanz waren beiden gemeinsam, Anthranilsäure zeigte nur eine der beiden Kranken. Entsprechend der hohen Xanthurensäureausscheidung zeigten beide Patientinnen mit beiden Methoden grosse, jedoch nicht vergleichbare Xanthurensäureflecken auf dem PCG. Auch die Flecken der anderen Stoffe waren durchgehend grösser als auf Chromatogrammen Stoffwechselgesunder.

Während diese Befunde allen Chromatogrammen gemeinsam waren, bestanden jedoch unterschiedliche chromatographische Bilder, die auf die verschiedene Methode der Harnkonzentrierung zurückgeführt werden können:

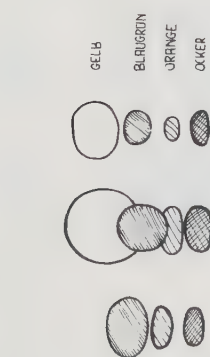
Bei der Metabolitenanreicherung nach DALGLIESH konnte auf dem PCG weder ein Nachweis von Harnstoff noch von Aminosäuren ausser Tryptophan geführt werden, bei unserem Verfahren werden die genannten Stoffe nicht aus dem Konzentrat entfernt. Ein weiterer Unterschied beider Verfahren zeigte sich hinsichtlich der erhaltenen



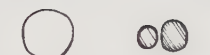
BLAU
OKER
GRÜBLAU



ORANGE
HELLBLAU
GELBBRON



GELB
BLAUGRÜN
ORANGE
OKER



GRÜNVIOLETT
VIOLETT



HELLBLAU
GELB



BRAUN
ROTVOLETT
ROTVOLETT
ROSVIOLETT
ROTBRAUN



EHRICH



UV-LICHT



NINHYDR

GRAUGELB



GREU



GRAUGELB



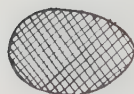
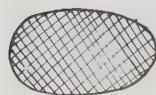
BLAUGRAU



FLEISCHROST



DUNKELROT



ROT

P-MOLYBDDIAZO

Fleckengrösse. Eine Aussage darüber war möglich, da einer der beiden Harn (dessen Chromatogramme wir halbschematisch wiedergeben) bei der Aufarbeitung nach beiden Methoden auf dem PCG grössenmässig vergleichbare Xanthurensäureflecken zeigte. Es fiel auf, dass trotz praktisch gleicher Xanthurensäuremenge die DALGLIESH-Methode bedeutend kleinere Flecken von 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Indol-3-Essigsäure, Indikan und unbekannter Substanz aufzuweisen hatte als unser Verfahren.

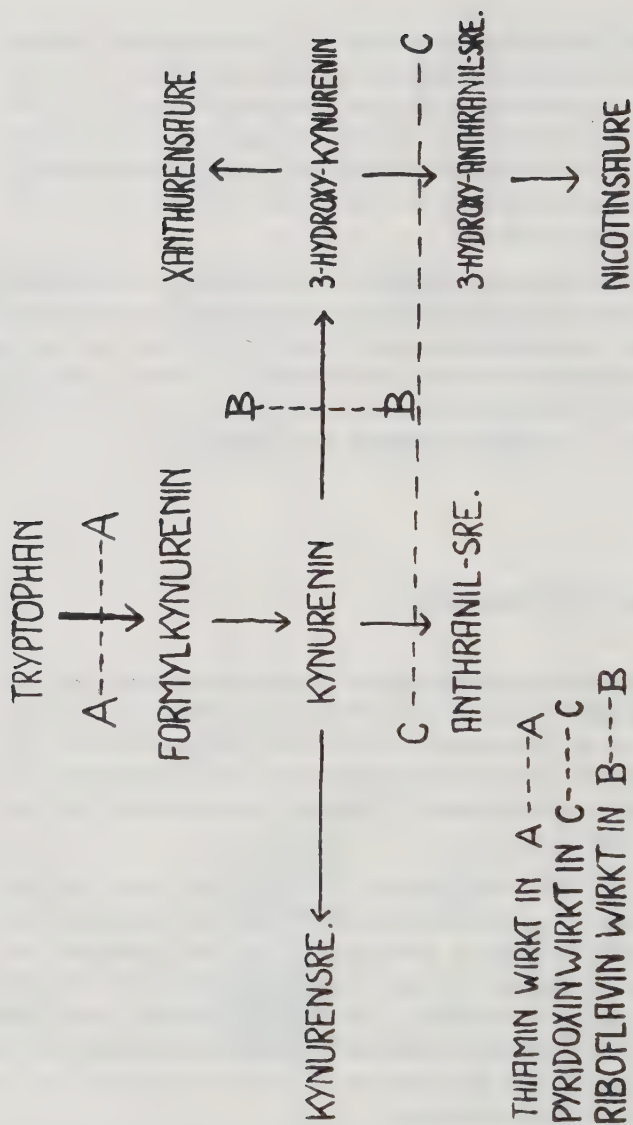
Aus den verwendeten Kohlerückständen bereiteten wir wiederum alkoholische Extrakte, engten sie ein und untersuchten sie papierchromatographisch. Die erhaltenen Streifen unterscheiden sich von den zugehörigen Harnproben nur durch die Fleckengrösse im PCG, nicht durch die Zahl der Metaboliten. (Bezeichnung im PCG: U_D = DALGLIESH-Verfahren, U_E = Eigenes Verfahren, K = Kohleextrakt.)

J. DISKUSSION DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen über die Ausscheidung von Tryptophanmetaboliten im Harn des Menschen unterscheiden sich in wesentlichen Punkten von den Aussagen, die andere Autoren auf Grund von Beobachtungen an Tieren, zum kleineren Teil auch an Menschen, nach Tryptophangabe machen konnten. Dies geht am deutlichsten aus einer Gegenüberstellung hervor:

DALGLIESH (99), auf dessen Arbeiten wir uns hier vor allem beziehen müssen, deutet das von ihm beobachtete Fehlen von Anthranilsäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure im Zustand eines Vitamin-B₆-Mangels und nach Tryptophanbelastung mit einer ungenügenden Funktion des Ferments Kynureninase, welches Vitamin B₆ als Coferment benötigt. Das gleiche Ferment macht DALGLIESH für das vermehrte Vorkommen von Kynurenin und Xanthurensäure nach Belastung mit Tryptophan verantwortlich, und begründet seine Ansicht wie folgt:

Unter den Bedingungen eines Vitamin-B₆-Mangels wird die Bildung von Anthranilsäure aus dem Kynurenin und die Entstehung von 3-Hydroxy-



Das Eingreifen der Cofermente in den Tryptophanabbau
(nach DALGLIESH)

Anthranilsäure aus dem 3-Hydroxy-Kynurenin zu einem Engpass im Abbau des Tryptophans, da die Kynureninase nicht in der Lage ist, in vollem Umfang ihre spaltende Funktion auszuüben. Umgekehrt wird dadurch jedoch der kynureninaseunabhängige Abbauweg begünstigt, sodass ausser Kynurenin vermehrt Xanthurensäure und Kynurensäure gebildet werden. (Vergleiche dazu das nebenstehende Schema über die Wirkung der Cofermente, gezeichnet nach DALGLIESH.) Bei funktionsfähiger Kynureninase, d.h. in Anwesenheit von Vitamin B₆, sollen nach Meinung von DALGLIESH Anthranilsäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure sowie die übrigen Metaboliten nebeneinander auftreten, ohne dass eine Vermehrung von Xanthurensäure, Kynureninsäure oder Kynurenin gegenüber den anderen Metaboliten festzustellen ist.

Diesen Ergebnissen und Vorstellungen setzen wir die wichtigsten Befunde unserer Arbeit entgegen:

Zunächst stellten wir fest, dass sowohl bei Stoffwechselgesunden als auch bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel die gleichen Metaboliten im Harn zur Ausscheidung gelangen. Beweise für eine einseitige Blockierung der Anthranilsäure- bzw. 3-Hydroxy-Anthranilsäurebildung im Zustand des Vitamin-B₆- Mangels konnten wir bei unseren Untersuchungen an Menschen nicht finden. Im Gegenteil: Bei den meisten stoffwechselgesunden Patienten und bei den meisten Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel fanden wir nach Tryptophanbelastung 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Xanthurensäure nebeneinander in den Harnproben. Ferner erschien uns besonders bemerkenswert, dass wir bei Stoffwechselgesunden kein häufigeres Auftreten von Anthranilsäure feststellen konnten als bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel. Dies hätte nach den Vorstellungen von DALGLIESH der Fall sein müssen.

Die Wirkung des Vitamins B₆ auf den Tryptophanstoffwechsel des Menschen konnten wir lediglich auf Grund der halbquantitativen Untersuchungen näher umreissen und erkennen. Dabei fanden wir nach Tryptophanbelastung bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel im allgemeinen nicht nur ein gleichzeitiges Auftreten von 3-Hydroxy-Anthranilsäure und Xanthurensäure, sondern auf Grund der Fleckengrösse auch eine Vermehrung in der Ausscheidung beider Stoffe, sowie auch aller anderen Metaboliten.

Die unmittelbare therapeutische Anwendung des Vitamin B₆ in Form des

Benadon konnte diese Ergebnisse nur bestätigen: Zeigten doch entsprechende Versuche, dass die Verabreichung von Vitamin B_6 an Patienten mit einem Vitamin- B_6 -Mangel zu keiner qualitativen Änderung in der Metabolitenausscheidung nach erneuter Tryptophanbelastung führt, sondern lediglich die Menge der zur Ausscheidung kommenden Stoffe beeinflusst. Denn neben einer nun verminderten Xanthurensäureausscheidung gegenüber dem Zustand des Vitamin- B_6 - Mangels zeigten die Patienten jetzt auch eine Verminderung aller übrigen Stoffe auf dem PCG.

In keinem Falle haben wir nach Vitamin- B_6 -Behandlung und erneuter Tryptophanbelastung Anthranilsäure oder 3-Hydroxy-Anthranilsäure im Harn der Patienten gefunden, wenn diese beiden Stoffe nicht vorher schon, im Zustand eines Vitamin- B_6 - Mangels, ausgeschieden worden waren.

Auf Grund unserer Ergebnisse sind wir der Meinung, dass dem Vitamin B_6 im Tryptophanabbau des Menschen nicht die Funktion einer Weiche im Angriffspunkt des Fermentes Kynureninase zukommt, wie sie DALGLIESH offensichtlich annimmt. Denn ein Mangel an Vitamin B_6 führt nicht zu einer Blockierung des Abbaus zu 3-Hydroxy-Anthranilsäure bzw. Anthranilsäure einerseits und zu einer Vermehrung von Xanthurensäure, Kynurensäure und Kynurenin andererseits, sondern zu einem vermehrten Auftreten sämtlicher Harnmetaboliten.

Eine Erklärung dafür, warum beim Vitamin- B_6 -Mangel des Menschen alle Metaboliten nach Tryptophangabe vermehrt im Harn erscheinen, ist auf Grund unserer heutigen Kenntnisse kaum zu geben. Ebenso unklar bleibt die Verwendung und das Schicksal der Hauptmenge des applizierten Tryptophans, von einigen Hinweisen abgesehen. So haben tierexperimentelle Untersuchungen ergeben, dass der Stickstoff aus N-markiertem Tryptophan in verschiedenen Aminosäuren wieder zu finden ist (100). Daraus kann auf die Bedeutung und Verwendung des Tryptophans für die Synthese anderer Aminosäuren geschlossen werden. Andererseits stellte sich heraus, dass ein erheblicher Anteil des überschüssigen Tryptophans unter Spaltung des Indol-Ringes bis zu CO_2 und H_2O abgebaut wird, wobei der markierte Stickstoff als Ammonium-Ion im Harn erscheint (101). Diese Erkenntnisse wurden am Tier gewonnen, ob sie auch für den Stoffwechsel des Menschen Gültigkeit besitzen wurde bisher noch nicht näher untersucht.

Schliesslich sei auf die Frage nach den Angriffspunkten des Vitamin B₆ im Tryptophanabbau des Menschen eingegangen: Es ist, abgesehen von Kynureninase, eine Reihe weiterer Fermente bekannt, die Vitamin B₆ als Coferment benötigen. Die Kenntnisse darüber sind zahlreichen Untersuchungen zu verdanken, die an tierischen Geweben und Organextrakten durchgeführt worden sind. Da Mensch und Tier empfindlich gegenüber einem Mangel an Vitamin B₆ sind, war es naheliegend, für den menschlichen Organismus ähnliche Ferment-Coferment-Verhältnisse anzunehmen, wie sie das Tierexperiment anschaulich gemacht hat. Der Vergleich unserer Ergebnisse mit den Untersuchungen von DALGLIESH macht jedoch deutlich, dass ein absoluter Vergleich der quantitativen Verhältnisse nicht durchgeführt werden kann. Mehr kann bisher nicht mit Sicherheit ausgesagt werden. Eine Wirkung des Vitamins auf derzeit noch unbekannte Stoffwechselreaktionen der Aminosäure kann in Betracht gezogen werden, ebenso eine Wirkung auf die unmittelbare Nikotinsäurebildung aus 3-Hydroxy-Anthranilsäure. Da jedoch dazu weder Versuche noch Ergebnisse vorliegen, erübrigt sich jede weitere Diskussion.

Wir können deshalb zusammenfassend nur sagen: Wir haben Anhaltspunkte für eine Beteiligung des Vitamin B₆ als Coferment an verschiedenen Schritten des Tryptophanstoffwechsels. Es entzieht sich jedoch bisher unserer Kenntnis, welche Reaktionen bestimmend für die quantitative Steuerung dieser Vorgänge sind.

K. ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die qualitative und so weit als möglich auch die quantitative Untersuchung der Ausscheidung von Tryptophan-Abbauprodukten bei Stoffwechselgesunden und bei Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel wurde zur Aufgabe gestellt. Dabei sollte besonders der Abbau der Aminosäure zur Nikotinsäure und dessen Abhängigkeit von Vitamin B₆ berücksichtigt werden.
- 2) Intravenös verabreichte Tryptophanderivate wurden im Organismus weder hydrolysiert noch abgebaut. Sie erwiesen sich infolgedessen für die Untersuchung des Tryptophanabbaus als unbrauchbar.

- 3) Nach oralen Gaben von d-Tryptophan wurden entsprechend früheren Untersuchungen folgende Metaboliten gefunden: Kynurenin, Indol-3-Essigsäure, Indikan und eine unbekannte Substanz. Orale Applikation von dl-Tryptophan führte bei Stoffwechselgesunden zur Ausscheidung von 3-Hydroxy-Kynurenin, 3-Hydroxy-Anthranilsäure, Xanthurensäure und den oben genannten Stoffen, einschliesslich Anthranilsäure.
- 4) Stoffwechselgesunde und Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel zeigten nach Gabe von dl-Tryptophan keinen qualitativen Unterschied in der Metabolitenausscheidung. Dagegen wurde bei Patienten mit einem Vitamin-B₆-Mangel nicht nur Xanthurensäure vermehrt im Harn gefunden, sondern sämtliche Metaboliten. Die Anzahl der nach Tryptophangabe ausgeschiedenen Stoffe war bei Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel in den meisten Fällen grösser als bei Stoffwechselgesunden.
- 5) Patienten mit Vitamin-B₆-Mangel zeigten nach Vitamin-B₆-Behandlung und erneuter Tryptophangabe eine Metabolitenausscheidung, die sich weder qualitativ noch quantitativ von der Stoffwechselgesunder unterscheiden liess. Der einzige Unterschied gegenüber stoffwechselgesunden Patienten war die zusätzliche Ausscheidung von Vitamin B₆ in Form von Pyridoxin.
- 6) Unterschiede zwischen älteren Befunden und unseren konnten durch Unterschiede in der Methodik erklärt werden. Wir konnten zeigen, dass die Verwendung von Aktivkohle, wie sie bei der am häufigsten verwendeten Methode zur Anreicherung von Tryptophanmetaboliten üblich ist, zu erheblichen Substanzverlusten führt, was sich wiederum auf die Endkonzentration der Substanzen auf den Chromatogrammen auswirkt.
- 7) Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse wurde für den Menschen eine andere als die bisher angenommene Wirkung des Vitamin B₆ auf den Tryptophanabbau angenommen. Die vermehrte Xanthurensäureausscheidung bei Vitamin-B₆-Mangel kann jedenfalls nicht mit einem Engpass im Abbau des Tryptophans zur Nikotinsäure an der Stelle der Kynureninase erklärt werden.

M E T H O D E N

A. KLINISCHE VERSUCHSANORDNUNG

Die Versuchspersonen bzw. Patienten erhielten 5 oder 10 g dl-Tryptophan nach der Abendmahlzeit mit Apfelmus oder sauren Fruchtsäften gemischt verabreicht. Anschliessend wurde der Harn 14 .. 15 Stunden gesammelt, gemessen, und Proben des gut gemischten Harns für die qualitative papierchromatographische Untersuchung und die quantitative Xanthurensäurebestimmung entnommen. Toluol wurde als Konservierungsmittel nur in den wärmsten Sommermonaten verwendet.

Bei vorhergegangenen Untersuchungen war gefunden worden, dass die überwiegende Menge der quantitativ gemessenen Xanthurensäure innerhalb von 14 Stunden nach der Tryptophangabe ausgeschieden wird. Weiter war bei mehrfachen Wiederholungen des Testes festgestellt worden, dass nach Gabe von nur 5 g dl-Tryptophan dieselben Veränderungen im Auftreten von Metaboliten zu beobachten sind und dass die Xanthurensäureausscheidung nach 5 g immer dann gegenüber dem Normalbereich erhöht ist, wenn auch nach 10 g eine vermehrte Ausscheidung gefunden wurde (104).

B. DIE QUANTITATIVE XANTHURENSÄUREBESTIMMUNG

Die Xanthurensäurebestimmungen im Harn wurden in Anlehnung an das von WACHSSTEIN und GUDAITIS beschriebene Verfahren durchgeführt (102). Dieses beruht auf der photometrischen Messung einer grünen Ferri-Xanthurensäure-Verbindung, die ohne weitere Anreicherungsverfahren bei p_H 7, 8 im Harn gebildet wird.

2 - 10 ml filtrierter Harn werden mit aqua dest. auf 10 ml aufgefüllt und mit 10 ml 0,4 molarer Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan-Pufferlösung von p_H 7,8 gemischt. 10 ml der Mischung, die als Leerwert dienen, werden abpipettiert und zu den restlichen 10 ml werden 0,1 ml einer 1,7 %igen, wässrigen Lösung von Ferriammoniumsulfat gegeben und gemischt. Fünf Minuten später kann gegen den Leerwert im Elco-Photometer bei 1 - 2 cm Schichtdicke mit dem Filter I 62,2 abgelesen werden. Die Konzentration wird einer Eichkurve entnommen.

Die quantitativen Xanthurensäurebestimmungen dienten nicht nur der Auslese der an Vitamin-B₆-Mangel leidenden Patienten, sondern ersparten zugleich die spezielle Trennung von Kynurensäure und Xanthurensäure auf dem PCG, um festzustellen, welcher der beiden Stoffe vermehrt auftritt.

C. DIE PAPIERCHROMATOGRAPHISCHE UNTERSUCHUNG

Bei der Herstellung der Papierchromatogramme hielten wir uns im wesentlichen an die Angaben von WISS und HELLMANN (105). 1 ml Harn wurde mit 4 ml Aceton gemischt und etwa 6 Stunden bei 0 - 5 °C aufbewahrt. Nach dem Abzentrifugieren des Präzipitates wurde die überstehende, klare Flüssigkeit mit einer Pipette abgehoben und das Aceton auf dem Wasserbad entfernt. Der in einem Vakuum-Exsiccator zum Trocknen gebrachte Rückstand wurde in 0,3 ml aqua dest. gelöst und je 0,02 ml auf das Papier (Schleicher & Schüll Nr. 2043/b, MgI) aufgetragen. Nach dem Trocknen wurde mit der organischen Phase einer Mischung von n-Butanol : Eisessig : Wasser = 4 : 1 : 5 eindimensional entwickelt.

Wir verwendeten dazu eine Kammer, welche das Einhängen von sechs Papiergrößen 31 x 29 cm gleichzeitig erlaubte. Auf jeden Bogen wurden 7 Harnproben in gleicher Reihenfolge aufgetragen, die einzelnen Bogen dann als ganze nach verschiedenen Verfahren ausgewertet.

Identifizierung der Metaboliten. Zur Identifizierung der Metaboliten auf den Chromatogrammen wurden Testsubstanzen bzw. Gemische

von Testsubstanzen auf den gleichen Papierbogen zusammen mit den Harnproben chromatographiert. Die Chromatogramme wurden nach einer Laufzeit von 12 - 14 Stunden luftgetrocknet und anschliessend mit verschiedenen Nachweisreagentien behandelt.

Die Verwendung der verschiedenen Nachweismethoden erlaubte eine gute Identifizierung der diskutierten Substanzen (siehe dazu die nachfolgende Tabelle).

Im einzelnen wurden verwendet:

- a) Der Fluoreszenznachweis im Ultraviolettbereich bei einer Wellenlänge von 365 m. Dazu wurde eine Quecksilber-Höchstdrucklampe CS 150 verwendet. Ausser den interessierenden Metaboliten trat eine wechselnde Zahl unbekannter, fluoreszierender Stoffe auf, die weiter nicht untersucht wurden.
- b) Ehrlichs Reagens (normal): Eine 2 %ige Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Salzsäure/Wasser-Gemisch = 1 : 6 wurde aufgesprüht und das behandelte Papier luftgetrocknet. Damit wurden vor allem Indol-Derivate, Harnstoff, Kynurenin, 3-Hydroxy-Kynurenin und Anthranilsäure sowie 3-Hydroxy-Anthranilsäure sichtbar.
- c) Ehrlichs Reagens (stark): Eine 2 %ige Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in Salzsäure/Wasser-Gemisch = 3 : 2 wurden wie unter b) angegeben verwendet. Sie erwies sich als besonders wertvoll für den raschen Nachweis von Indolderivaten und zur Unterscheidung von aromatischen Aminen.
- d) Ninhydrin-Reagens: Verwendet wurde eine 0,2 %ige Lösung von Ninhydrin in n-Butanol/Eisessig-Gemisch = 19 : 1. Das Reagens wurde aufgesprüht, und der Papierbogen 5 Minuten bei 105 ° C getrocknet. Auf diese Weise wurden aliphatische und aromatische Aminosäuren nachgewiesen.
- e) Silbernitrat-Reagens: Ein Gemisch aus n/10 AgNO₃-Lösung und gesättigter Ammoniak-Lösung (Verhältnis = 3 : 1) wurde aufgesprüht, dann das Papier an der Luft bei Normaltemperatur getrocknet. Da vor allem o-Amino-Phenole auf diese Färbung rasch ansprechen, war sie für den Nachweis von 3-Hydroxy-Kynurenin und 3-Hydroxy-Anthranilsäure wichtig.

METABOLITEN UND R _f -WERTE. (PARTRIDGE-GEMISCH)	FLUO- RESZENZ	EHRLICH'S REAGENS(M)	EHRLICH'S REAGENS(S)	NINHYDRIN	SILBERNITRAT	DIAZO-REAG. + NH ₃	PHOS-MOLYBD. + NH ₃	NICOTINSKE- FÄRBUNG	VITAMIN-B ₆ - FÄRBUNG
TRYPTOPHAN _{0.42}	—	BLAU- VIOLETT	BLAU- VIOLETT	BRAUN- GRAU	—	—	—	—	—
KANURENIN _{0.37}	HELL- BLAU	ORANGE	ORANGE (SPÄTER)	VIOLETT- BLAU	—	—	—	—	—
3-OH-KANURENIN _{0.34}	GELB- GRÜN	ROSA	ROSA (SPÄTER)	VIOLETT	GRAU- SCHWARZ	ROT	GRAU- GRÜN	—	—
XANTHURENSE. _{0.58}	BLAU- VIOLETT	—	—	—	—	ROT	GRAU	—	—
3-OH-ANTHRANILS _{0.82}	HELL- BLAU	GELB	GELB	—	GRAU- SCHWARZ	FLEISCH- ROSA	GRAU- GRÜN	—	—
ANTHRANILS. _{0.86}	BLAU	DUNKEL- GELB	DUNKEL- GELB	—	—	—	—	—	—
INDOL-3-ESSIGS. _{0.89}	RÖTLICH- GELB	BLAU (SPÄTER)	BLAU	—	—	—	—	—	—
INDIKAN _{0.56}	—	BRAUN	BRAUN	—	—	—	—	—	—
UNBEKANNTE SUBS. _{0.80}	GELB- GRÜN	GRAU- VIOLETT	GRAU	—	—	—	—	—	—
VITAMIN B ₆ _{0.57}	ABSORB- TION	—	—	—	BRAUN	ROT- BRAUN	GRAU	—	SMARAGD- GRÜN
NICOTINSÄURE _{0.75}	ABSORB- TION	—	—	—	—	—	—	ZIEGEL- ROT	—

Die Färbungen und R_f-Werte der Metaboliten

- f) Diazo-Reagens: Ein frisch hergestelltes Gemisch aus 5 ml 0,5 %iger Sulfanilsäure in 1 %iger HCL und 0,15 ml 0,5 %iger wässriger Natriumnitrit-Lösung wurde aufgesprüht. Nach kurzem Einwirken wurden die Papiere in Ammoniak-Atmosphäre entwickelt. Es wurden damit alle Stoffe erfasst, die eine phenolische OH-Gruppe tragen.
- g) Phosphor-Molybdänsäure-Reagens: Eine 1 %ige, wässrige Lösung von Phosphor-Molybdänsäure wurde aufgesprüht, nach kurzem Einwirken die Papiere in einer Ammoniak-Atmosphäre entwickelt. Mit dieser Färbung wurden die gleichen Stoffe wie mit der Diazo-Färbung erfasst, sie erwies sich jedoch als empfindlicher, haltbarer und besonders zum Nachweis kleiner Mengen geeignet.
- h) Nachweis der Nikotinsäure bzw. ihrer Derivate: Die Chromatogramme wurden über Nacht in eine Bromcyan-Atmosphäre bei Zimmertemperatur gebracht. Anschliessend wurde mit einer 2,5 %igen Benzidin-Lösung in 50 %igem Äthanol besprüht. Neben Nikotinsäure ist Nikotinsäureamid mit dieser Färbung nachweisbar, dagegen nicht Vitamin B₆. Die Färbung ist sehr empfindlich.
- i) Bezüglich der Vitamin-B₆-Färbung sei auf den Nachweis mit Folins Reagens und andere hingewiesen (103).

Die Nachweisgrenzen für die einzelnen Färbungen wurden durch Verdünnungsreihen der Testsubstanzen festgestellt, die Ergebnisse tabellarisch zusammengefasst. Siehe dazu die nachfolgende Zusammenstellung.

Untersuchung von Reinsubstanzen. Für alle als Metaboliten auftretenden Stoffe ausser der unbekannten Substanz waren Testsubstanzen vorhanden. Diese wurden hinsichtlich ihrer R_f -Werte, ihrer Färbbarkeit und der Veränderungen dieser Färbungen mit der Zeit untersucht. Die gewonnenen Ergebnisse wurden für die Erkennung der Harnmetaboliten verwendet.

Untersuchung von Harnen. Die in den Harnen auftretenden Metaboliten zeigten eine Anordnung in zwei grossen Gruppen: Indol-3-Essigsäure, 3-Hydroxy-Anthransäure und die unbekannte Substanz bildeten die Gruppe mit grösseren R_f -Werten, Xanthurensäure, Harn-

	TRYP.	KYN.	3-OH-KYN	XANT.S.	3-OH-A.S.	A.S.	1-3-E.	INDIC.	U.S.	VIT.B ₆	NIK-SRE
FLUORESCENZ	—	0,1	0,1	1	0,1	1	1	—		—	—
EHRlich-NORMAL	1	0,5	1	—	1	1	0,5	1		—	—
EHRlich-STARKE	1	0,5	1	—	1	1	0,5	1		—	—
NINHYDRIN	0,5	0,5	0,5	—	—	—	—	—		—	—
SILBERNITRAT	—	—	0,5	—	0,5	—	—	—		1	—
DIAZO-REAGENS	—	—	0,1	0,1	5	—	—	—		1	—
PHOS-MOLYBDAT	—	—	0,1	0,1	0,1	—	—	—		1	—
NIKOTINSRE-FBG.	—	—	—	—	—	—	—	—		—	0,1
VIT.B ₆ -FBG.	—	—	—	—	—	—	—	—		0,1	—

Die Empfindlichkeit der Nachweismethoden (angegeben in γ reiner Testsubstanz)

stoff, Indikan, Tryptophan, Kynurenin und 3-Hydroxy-Kynurenin die mit niedrigeren. Die selten vorkommende Anthranilsäure fand sich in der ersten Gruppe.

Gegenüber den Reinsubstanzen zeigten die Harnmetaboliten eine Erniedrigung der R_f -Werte im ganzen, was auf den Salzgehalt der Konzentrate und darüber hinaus auf die Konzentration der Harne zurückgeführt wurde. Harne mit einem niedrigen spezifischen Gewicht zeigten stets etwas grössere R_f -Werte als solche mit höherer Stoffkonzentration. Auf die Anordnung und Reihenfolge der einzelnen Metaboliten innerhalb der Gruppen blieb dies jedoch ohne Einfluss.

Zur Identifizierung der einzelnen Metaboliten wurden die Papierbogen in Streifen geschnitten, entsprechend den sieben aufgetragenen Harnproben. Die jeder Probe entsprechenden Streifen wurden nebeneinander gelegt und auf Grund des jedem Papierbogen eigenen Nachweisverfahrens gemeinsam ausgewertet.

Der Mengenvergleich der einzelnen Metaboliten erfolgte stets nur innerhalb der entsprechenden Harnprobe auf Grund der Fleckengrösse. Ausgangspunkt war dabei die Grösse des Xanthurensäurefleckes, auf den hin alle anderen bezüglich ihrer Grösse verglichen wurden. Zwei Harnproben von verschiedenen Patienten wurden nur dann mit einander verglichen, wenn sich die Grösse ihrer Xanthurensäureflecken als vergleichbar erwies. Der Vergleich erfolgte auf dem mit UV-Licht entwickelten Chromatogramm, da dort eine Veränderung der Fleckengrösse durch Einwirkung von Reagentien ausgeschlossen war.

Wegen der Veränderlichkeit der Anfärbbarkeit und der Färbungen wurden die Chromatogramme dreimal betrachtet: Zunächst sofort nach dem Besprühen, dann am folgenden Tag, zuletzt eine Woche nach dem Entwickeln. Die Behandlung mit Reagentien und UV-Licht erfolgte längstens 12 Stunden nach Herausnahme aus der Entwicklungskammer.

D. VERGLEICH DER ANGEWENDETEN METHODE MIT DER METHODE ZUR GEWINNUNG VON HARNKONZENTRATEN NACH DALGLIESH

Vergleicht man die angewendete Methode zur Gewinnung von Harnkonzentraten mit der des genannten Verfassers, muss zunächst die Brauchbarkeit beider Verfahren für rein qualitative Zwecke hervorgehoben werden. Die Methode von DALGLIESH bietet ausserdem die Möglichkeit, in einem Arbeitsgang grössere Harnmengen aufzuarbeiten und dadurch entsprechende Metabolitenkonzentrationen zu gewinnen. Diese liegen im Konzentrat in reinerer Form vor, nämlich praktisch frei von Harnstoff und Salzen. Dadurch wird die Depression der R_f -Werte bei Harnmetaboliten, wie wir sie bei unserem Verfahren feststellen mussten auf Grund des Salzgehaltes, vermieden, und der Vergleich mit den R_f -Werten reiner Testsubstanzen erleichtert.

Gegenüber diesen unbestrittenen Vorteilen des DALGLIESH-Verfahrens muss jedoch auf einen entscheidenden Nachteil dieser Methode hingewiesen werden, den DALGLIESH selbst angibt: Das Verfahren ist nicht quantitativ, da die verwendete Aktiv-Kohle einen Teil der Metaboliten und zwar einen erheblichen, wie wir feststellen mussten, zurückhält. Noch nachteiliger wirkt sich die verschieden starke Adsorption der einzelnen Metaboliten auf die Zusammensetzung des gewonnenen Konzentrates aus, da dadurch die Mengenverhältnisse der einzelnen Metaboliten zueinander stark verändert werden. Wir möchten sogar annehmen, dass kleine Metabolitenmengen mit starker Adsorption an die Kohle praktisch im Eluat fehlen. Nach unserer Feststellung konnte dieser Nachteil, auf den auch DALGLIESH hinweist, durch eine Nachbehandlung der Kohle mit 96 %igem Alkohol in gewissem Mass beseitigt werden.

Für unsere Untersuchungen, die nicht nur den qualitativen Nachweis der Metaboliten zum Ziel hatten, sondern bei denen auch der Mengenvergleich interessierte, besonders hinsichtlich des Auftretens von Xanthurensäure und 3-Hydroxy-Anthranilsäure, konnte aus den genannten Gründen das Verfahren nach DALGLIESH nicht verwendet werden. Das von uns angewendete Verfahren zeigte sich dagegen brauchbar, wenn wir uns auch bewusst sind, dass es exakten quantitativen Bestimmungen und da-

rauf aufgebauten Mengenvergleichen stets unterlegen sein wird. Wegen seiner zeitsparenden Einfachheit wird es jedoch bei Routine-Untersuchungen vorzuziehen sein.

Herrn Professor Dr.Dr. G. BODECHTEL danke ich für die Möglichkeit, diese Arbeit durchzuführen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privat-Dozenten Dr. H. MASKE für die Überlassung des Themas und das Interesse an meiner Arbeit, darüber hinaus für die Förderung, die ich durch ihn in jeder Weise erfahren habe.

Herrn Professor Dr.Dr. K. DIRR danke ich für die so oft gewährte Hilfe.

Der Deutschen Hoffmann - La Roche A.G. bin ich verpflichtet für die zur Verfügung gestellten Substanzen.

L I T E R A T U R

1. Willcock, E.G., F.G. Hopkins:
J. Physiolog. London 35, 88 (1906/07)
- Abderhalden, E.: H. 77, 22 (1912)
2. Liebig, J.: A. 86, 125 (1853)
3. Eckhard, G.: A. 97, 258 (1856)
4. Liebig, J.: A. 86, 125 (1853)
5. Ellinger, A.: H. 43, 325 (1904/05)
6. Matsuoka, Z., S. Takemura, N. Yoshimatsu:
H. 143, 199 (1925)
7. Hauser, A.: A. e. e. P. P., 36, 1 (1895)
- Solomin, P.: H. 23, 497 (1897)
- Homer, A.: J. biol. Chem. 22, 391 (1915)
8. Hauser, A.: A. e. P. P., 36, 1 (1895)
9. Hauser, A.: A. e. P. P., 36, 1 (1895)
10. Matsuoka, Z., Yoshimatsu, N.:
H. 143, 206 (1925)
11. Kotake, Y. und Mitarbeiter:
H. 195, 139 (1931)
- " 147 "
- " 152 "
- " 158 "
- " 166 "
- " 171 "
- " 179 "
- " 184 "

Kotake, Y. und Mitarbeiter:

H. 195, 192 (1931)

" 202 "

" 208 "

12. Musajo, L.: Atti. Accad. naz. Lincei (6) 21, 368 (1935)

13. Mehler, A.H., W.E. Knox:

J. biol. Chem., 187, 431 (1950)

14. Butenandt, A., W. Weidel, R. Weichert, W. v. Derjugin:

H. 279, 27 (1943)

Butenandt, A., W. Weidel, W. v. Derjugin:

Naturwiss. 30, 51 (1942)

15. Heidelberger, G., M.E. Gullberg, A.F. Morgan, S. Lepkovsky:

J. biol. Chem., 175, 471 (1948)

16. Schayer, R.W.: J. biol. Chem., 187, 777 (1950)

17. Schayer, R.W.: J. biol. Chem., 187, 777 (1950)

18. Wiss, O.: Z. Naturforsch., 7b, 133 (1952)

19. Wiss, O.: H. 293, 106 (1953)

20. Wiss, O.: Z. Naturforsch., 7b, 133 (1952)

21. Kotake, Y., S. Otani: H. 214, 1 (1933)

22. Wiss, O., F. Hatz: Helv. 32, 532 (1949)

Wiss, O., F. Hatz, G. Viollier:

Helv. physiol. Acta 7c, 29 (1949)

Braunstein, A.E., E.V. Goryachenkova, T.S. Pakhina:

Biochimija Moskau 14, 163 (1949)

23. Dalglish, C.E., W.E. Knox, A. Neuberger:

Nature 168, 20 (1951)

24. Wiss, O.: Z. Naturforsch., 7b, 131 (1952)

25. Wiss, O.: Helv. 32, 1694 (1949)

26. Stanier, R.Y., O. Hayaishi:
Science, N.Y., 114, 326 (1951)
27. Krehl, W.A., L.J. Teply, P.S. Sarma, C.A. Elvehjem:
Science, N.Y., 101, 489 (1945)
- Schweigert, B.S., P.B. Pearson:
J.biol.Chem., 172, 485 (1948)
- Wiss, O., G. Viollier, M. Müller:
Helv. 33, 771 (1950)
28. Elvehjem, C.A., B.J. Madden, F.M. Strong, D.W. Wooley:
J.biol.Chem., 123, 237 (1938)
29. Rosen, F., J.W. Huff, W.A. Perlzweig:
J.biol.Chem., 163, 343 (1946)
- Schweigert, B.S., P.B. Pearson:
J.biol.Chem., 168, 555 (1947)
30. Huff, J.W., W.A. Perlzweig, R. Forth, F. Spilman:
J.biol.Chem., 142, 401 (1942)
31. Heidelberger, G., M.E. Gullberg, F. Morgan, S. Lepovsky:
J.biol.Chem., 175, 471 (1948)
32. Beadle, G.W., E.L. Tatum:
Amer.J.Bot. 32, 678 (1945)
- Bonner, D., G.W. Beadle:
Arch.Biochem. 11, 319 (1946)
33. Beadle, G.W., H.K. Mitchell, J.W. Nyc:
Proc.nat.Acad.Sci. USA 33, 155 (1947)
34. Mitchell, H.K., J.F. Nyc:
Proc.nat.Acad.Sci. USA 34, 1 (1948)
35. Bonner, D.:
Proc.nat.Acad.Sci. USA 34, 5 (1948)
36. Rosen, F., J.W. Huff, W.A. Perlzweig:
J.Nutrit. 33, 561 (1947)

37. Mitchell, H.K., J.F. Nyc, R.D. Owen:
J.biol.Chem., 175, 433 (1948)
38. Wiss, O., G. Viollier, M. Müller:
Helv. 33, 771 (1950)
39. Krehl, W.A., L.M. Henderson, J. de la Hueraga, C.A. Elvehjem:
J.biol.Chem., 166, 531 (1946)
40. Heidelberger, G., M.E. Gullberg, A.F. Morgan, S. Lepkovsky:
J.biol.Chem., 175, 471 (1948)
41. Greenberg, D.M., Sanadi, D.R.:
Arch.Biochem. 25, 323 (1950)
42. Wiss, O., H. Fuchs: Helv. 32, 2553 (1949)
43. Butenandt, A., W. Weidel, H. Schlossberger:
Z.Naturforsch. 4b, 24 (1949)
44. Ellinger, P., G. Fraenkel, M.M. Abd el Kader:
Biochem.J. 41, 559 (1947)
45. Butenandt, A., H. Schlossberger:
B. 85, 562 (1952)
46. Makino, K.: Nature 167, 115 (1951)
47. Henderson, L.M., H.M. Hirsch:
J.biol.Chem. 181, 667 u. 687 (1949)
48. Krehl, W.A., D. Bonner, C. Yanofsky:
J.Nutrit. 41, 159 (1950)
49. Bonner, D., C. Yanofsky:
Proc.nat.Acad.Sci. USA 35, 576 (1949)
50. Bonner, D., C. Yanofsky:
J.biol.Chem. 190, 211 (1951)
51. Henderson, L.M.: J.biol.Chem. 178, 1005 (1949)
52. Henderson, L.M.: J.biol.Chem. 181, 677 (1949)
53. Bokman, A., B.S. Schweigert:
J.biol.Chem. 186, 153 (1950)

54. Wiss, O.: Z. Naturforsch. 96, 740 (1954)
55. Mehler, A.H.: J. biol. Chem. 218, 241 (1956)
56. Dalgliesh, C. E.: Quart. Rev. 5, 227 (1951)
57. Dalgliesh, C. E.: Biochem. J. 62, 625 (1956)
58. Wiss, O., G. Bettendorf:
Hoppe-Seylers Z. (Heft 4 - 6) 306, 145 (1957)
59. Schayer, R. W., L. M. Henderson:
J. biol. Chem. 195, 657 (1952)
60. Henderson, L. M., L. V. Hanks:
J. biol. Chem. 225, 1069 (1956)
61. Udenfriend, S., C. T. Clark, E. Titus:
Experientia 8, 379 (1952)
62. Ek, A., B. Witkop: J. Amer. Chem. Soc. 75, 500 (1953)
63. Beiler, J. M., G. J. Martin:
Federation Proc. 13, 180 (1954)
64. Tatum, E. L., D. Bonner:
Proc. nat. Acad. Sci. USA 30, 30 (1944)
65. Yanofsky, C.: J. biol. Chem. 194, 279 (1952)
66. Tatum, E. L., D. Shemin:
J. biol. Chem. 109, 673 (1936)
67. Dalgliesh, C. E.: Advances of Protein Chemistry 10, 58 (1955)
68. Gibson, R. B.: Nature 175, 853 (1955)
69. Yanofsky, C.: Nature, 175 853 (1955)
70. C. A. 49, 4777 f
71. C. A. 49, 4777 f
72. Jakoby, F.: J. biol. Chem. 207, 657 (1953)
73. Knox, W. E., A. H. Mehler:
J. biol. Chem. 187, 419 (1950)

74. Wiss, O.: Helv. 32, 532 (1949)
75. Wiss, O.: Z. physiol.Ch. 293, 106 (1953)
76. Dalglish, C.E.: Biochem.J. 61, 328 (1955)
77. Jakoby, F., D. Bonner: J. biol. Chem. 221, 689 (1956)
78. Lepkovsky, S., E. Roboz, A.J. Haagen-Smit:
 J. biol. Chem. 149, 195 (1943)

 Axelrod, H.E., A.S. Morgan, S. Lepkovsky:
 J. biol. Chem. 160, 155 (1945)

 Porter, C.C., I. Clark, R.H. Silber:
 J. biol. Chem. 167, 573 (1947)
79. Rosen, E., J.W. Huff, W.A. Perlzweig:
 J. Nutrit. 33, 561 (1947)

 Schweigert, B.S., P.B. Pearson:
 J. biol. Chem. 168, 555 (1947)
80. Sarett, H.P., G.A. Goldsmith:
 J. biol. Chem. 177, 461 (1949)
81. Henderson, L.M.: J. biol. Chem. 189, 19 (1951)
82. Hurt, W.W., B.T. Scheer, H.J. Deuel:
 Arch. Biochem. 21, 87 (1949)
83. Henderson, L.M., R.E. Koski, F.D'Angeli:
 J. biol. Chem. 215, 369 (1955)
84. Dalglish, C.E., W.E. Knox, A. Neuberger:
 Nature 168, 20 (1951)
85. Wiss, O.: Z. Naturforsch. 7b, 134 (1952)
86. Lepkovsky, S., E. Roboz, A.J. Haagen-Smit:
 J. biol. Chem. 149, 195 (1943)
87. Schweigert, B.S.: J. biol. Chem. 175, 535 (1948)
88. Henderson, L.M.: J. biol. Chem. 189, 19 (1951)

89. Porter, C.C.: Arch.Biochem. 18, 339 (1948)
90. Dalglish, C.E.: Biochem.J. 61, 328 (1955)
Biochem.J. 53, 513 (1953)
91. Musajo, L.: Bull.Soc.Chim.Biol. 35, 717 (1953)
92. Perlzweig, W.A.: J.biol.Chem. 167, 511 (1947)
93. Makino, K.: J.biol.Chem. 196, 185 (1952)
94. Musajo, L.: Nature 175, 855 (1955)
95. Kotake, Y.: J.Biochem.Japan. 40, 295 (1952)
96. Dalglish, C.E., S. Tekman:
Biochem.J. 56, 458 (1954)
97. Dalglish, C.E.: Biochem.J. 61, 334 (1955)
98. Boyland, E.: Biochem.J. 60, 5 (1955)
99. Dalglish, C.E.: J.Clin.Path. 1, 73 (1955)
100. Schayer, R.W.: J.biol.Chem. 187, 777 (1950)
101. Schayer, R.W.: J.biol.Chem. 187, 777 (1950)
102. Wachsstein, M., M.T. Gudaitis:
Am.J.Clin.Path. 22, 652 (1952)
103. Maiwald, L., H. Maske:
Hoppe-Seylers Z. 306, 143 (1956)
104. Maske, H.: Klin.Wochenschr. 35, 561 (1957)
105. Wiss, O., H. Hellmann:
Z.Naturforsch. 8b, 2 (1953)
Hellmann, H.: Hoppe-Seylers Z. 287, 205 (1951)

L E B E N S L A U F

Am 30.6.1927 wurde ich, Lucius Maiwald, als zweites Kind des Gutsbesitzers J.u.Dr. et Ing.agr. Lucius Maiwald und seiner Gattin Maria Annuntiata, geb. v. Elefanthy in Fischamend bei Wien geboren. Mit sechs Jahren trat ich 1933 in die tschechische Volksschule in Iglau (CSR) ein, die ich bis 1938 besuchte. Von 1938 bis 1943 war ich Schüler der deutschen Oberschulen in Neutitschein und Wagstadt (CSR). Nach Abschluss der 5. Klasse Oberschule wurde ich als Luftwaffenhelfer einberufen, es folgten Arbeitsdienst und Wehrdienst mit dreimonatigem Fronteinsatz, anschliessend ein Jahr tschechische Gefangenschaft. Nach der Entlassung im Juli 1946 wurde ich zugleich mit meinen Eltern nach Bayern ausgewiesen und in Landshut untergebracht. Im Herbst dieses Jahres trat ich auf Grund einer besonderen Erlaubnis des bayerischen Kultusministeriums in die 8. Klasse der Landshuter Oberrealschule ein, im Sommer 1947 konnte ich mit Erfolg absolvieren. Nach dem Abitur leistete ich ein halbes Jahr Wiederaufbaudienst an der Münchener Universität und erhielt darauf hin die Erlaubnis, mit einem Studium zu beginnen. Ich immatrikulierte und begann meinen Studienweg mit Tiermedizin im Sommersemester 1948. Im Frühjahr 1949 wechselte ich die Fakultät und wandte mich dem Studium der Chemie zu. 1952 konnte ich an der Universität München das Vordiplom erwerben, die nächsten vier Semester sahen mich im chemischen Institut der phil.-theol. Hochschule in Regensburg, da ich in München keinen Arbeitsplatz bekommen konnte. Im Herbst 1954 schloss ich das Chemiestudium mit der Diplomprüfung an der Universität München ab. Im Winter des gleichen Jahres begann mein Medizinstudium an der Universität München, 1956 unterzog ich mich der ärztlichen Vorprüfung. Im Sommer 1959 legte ich mein medizinisches Staatsexamen ab.

